

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

#### Influence de l'atrazine en contamination chronique sur les systèmes reproducteur et immunitaire des juvéniles du carassin doré *Carassius auratus auratus*

Gillardin, Virginie

*Award date:*  
2002

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Influence de l'atrazine en contamination chronique  
sur les systèmes reproducteur et immunitaire  
des juvéniles du carassin doré *Carassius auratus auratus***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Virginie Gillardin

Août 2002



**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix****FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18. - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20.

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Influence de l'atrazine en contamination chronique sur les systèmes  
reproducteur et immunitaire des juvéniles du carassin doré**  
***Carassius auratus auratus***

GILLARDIN Virginie

Résumé

Depuis plusieurs années, le monde scientifique prend conscience de l'impact qu'ont certains polluants sur le système endocrinien et immunitaire d'organismes aquatiques. Afin de caractériser l'impact de l'atrazine en tant que perturbateur endocrinien potentiel, nous avons étudié en contamination chronique (31, 52, 77 et 98 jours) les effets de doses subléthales (10 et 100 µg/l) de cet herbicide sur les fonctions reproductives, immunitaires et sur des indicateurs de stress du carassin doré *Carassius auratus auratus*. Nous n'avons pu mettre en évidence aucun changement du rapport gonadosomatique chez les femelles. De plus, les niveaux en testostérone et oestradiol plasmatiques ne sont pas affectés ( $p > 0,05$ ). Concernant le système immunitaire, seuls les ions superoxydes des leukocytes phagocytaires présentent une augmentation, passant de  $0,17 \pm 0,03$  à des niveaux supérieurs à 2,00 nM NBT ( $p < 0,05$ ). Pour les indicateurs de stress, seule l'osmolarité sanguine est affectée chez les animaux intoxiqués et passe de  $285,09 \pm 10,81$  à  $340 \pm 12,49$  mOsm chez des individus contaminés. Nos résultats ne nous permettent pas de conclure à un effet délétère de l'atrazine sur le système reproducteur et sur le système immunitaire. Cependant, certains paramètres de stress semblent nous indiquer un effet perturbateur significatif de ce polluant. Des études complémentaires devraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'atrazine.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Aôut 2002

Promoteur: P. Kestemont

## Remerciements

*Arrivée au terme de ce travail, j'ai le plaisir d'adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont permis de réaliser ce mémoire de fin d'études. Je tiens d'abord à remercier Monsieur Patrick Kestemont pour m'avoir permis d'effectuer mon mémoire au sein de son équipe. Je le remercie chaleureusement pour sa disponibilité, son accueil, et ses nombreux conseils qui m'ont toujours été très précieux.*

*Ma reconnaissance va également à Laura Spano', qui a su me guider au mieux tout au long de ce travail. Sa porte fut toujours ouverte pour mes questions et mes doutes. Merci à toi Laura pour ta franchise et tes bons conseils.*

*J'adresse également mes remerciements à François Darchambaud et Gersande Blanchard pour leur patience lorsque je ne comprenais rien aux statistiques.....ça va un peu mieux maintenant!*

*Merci également à Fred , Pat et tous les autres membres de l'URBO pour ces quelques mois passés ensemble et qui resteront de merveilleux souvenirs. Je m'en voudrais d'oublier Robert qui a toujours fait preuve d'une grande gentillesse et patience à mon égard.*

*Merci à Philippe Coppe d'avoir guidé mes premiers pas dans le domaine de la biologie moléculaire. Merci également à Jean-Jacques Letesson d'avoir accepté d'être co-promoteur de ce mémoire.*

*Enfin, et surtout, merci à tous ceux que j'aime pour avoir supporté mes sautes d'humeur de ces dernières semaines...*

Virginie



# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1. L'atrazine.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introduction.....	1
1.2. Comportement dans les masses d'eau.....	2
1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques.....	2
1.2.2. Entrée dans les masses d'eau.....	2
1.2.3. Dégradation et persistance de l'atrazine.....	2
A. Dégradation de l'atrazine.....	2
B. Persistance de l'atrazine.....	3
1.2.4. Bioamplification de l'atrazine.....	4
1.3. Caractère toxique de l'atrazine.....	5
1.3.1. Bioconcentration de l'atrazine.....	5
1.3.2. Toxicité de l'atrazine.....	5
<b>2. Effets des polluants sur le système reproducteur : la perturbation endocrinienne chez le poisson.....</b>	<b>7</b>
2.1. Introduction.....	7
2.2. Généralités de la perturbation endocrinienne.....	8
2.2.1. Définitions.....	8
2.2.2. Modes d'action des perturbateurs endocriniens.....	8
A. Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire.....	9
B. Altération des enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse.....	9
C. Altération des protéines de transport.....	10
D. Fixation à un récepteur spécifique : agonisme et antagonisme.....	10
E. Altération de l'élimination des stéroïdes par le foie.....	11
1.2.3. La perturbation endocrinienne: organisation versus activation.....	11
1.3. Action des polluants sur les systèmes reproducteurs femelle et mâle.....	12
1.3.1. Le système reproducteur chez le poisson téléostéen : rappel.....	12
1.3.2. Perturbation du système reproducteur femelle.....	13
A. Altération de la morphologie ovarienne et du développement ovocytaire.....	14
B. Altération de la stéroïdogénèse ovarienne.....	16
C. Autres effets des polluants sur le système reproducteur femelle.....	17
1.2.3. Perturbation du système reproducteur mâle.....	18
A. Altération de la morphologie testiculaire et de la spermatogénèse.....	18
B. Altération de la stéroïdogénèse testiculaire.....	20
C. Altération du comportement de reproduction.....	21
D. Autres effets des polluants sur le système reproducteur mâle.....	21
<b>2. Effets des polluants sur le système immunitaire : L'immunotoxicologie chez le poisson.....</b>	<b>22</b>
3.1. Introduction.....	22
3.2. Le système immunitaire chez le poisson.....	22
3.3. Effets des polluants sur l'immunité non-spécifique.....	23
3.3.1. Introduction.....	23
3.3.2. L'immunité non-spécifique externe.....	24
A. La muqueuse branchiale.....	24
B. La muqueuse cutanée.....	25
3.3.3. L'immunité non-spécifique interne.....	25



A. Les facteurs humoraux .....	25
B. Les facteurs cellulaires.....	27
3.4. Effets des polluants sur l'immunité spécifique.....	30
3.5. La modulation du système immunitaire par les hormones.....	31
3.5.1. Introduction .....	31
3.5.2. Modulation par les stéroïdes sexuels .....	31
A. L'oestradiol .....	31
B. La testostérone.....	32
C. La 11-Kétotestostérone .....	32
3.5.3. Modulation par le cortisol .....	32
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Espèce ciblée.....</b>	<b>34</b>
<b>2. Contamination chronique.....</b>	<b>34</b>
2.1. Dispositif expérimental .....	34
2.2. Contamination des bassins par l'atrazine .....	35
2.3. Prélèvements .....	35
<b>3. Paramètres étudiés.....</b>	<b>36</b>
3.1. Paramètre morphométrique .....	36
3.2. Paramètres hormonaux .....	37
1.2.1. Dosage des stéroïdes sexuels : testostérone, 11-kétotestostérone et	
17 $\beta$ -oestradiol.....	37
A. Principe.....	37
B. Méthode.....	37
3.3. Paramètres caractérisant le stress .....	38
3.3.1. Dosage du cortisol.....	38
3.3.2. Dosage du glucose.....	38
A. Principe.....	39
B. Méthode.....	39
C. Calcul de la droite de régression et des résultats.....	39
3.3.3. Osmolarité.....	39
3.4. Paramètres immunitaires.....	40
3.4.1. Comptage des cellules lymphocytaires .....	40
A. Principe.....	40
B. Méthode.....	40
C. Calcul des résultats .....	40
3.4.2. Dosage du lysozyme.....	40
A. Principe.....	41
B. Méthode.....	41
C. Calcul de la courbe standard et des résultats.....	41
3.4.3. Quantification de l'activité des leukocytes phagocytaires.....	41
A. Principe.....	41
B. Méthode.....	42
C. Calcul de la courbe standard et des résultats.....	42
<b>Résultats.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Le taux de survie.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Paramètres morphométrique et histologique .....</b>	<b>44</b>
<b>3. Les stéroïdes sexuels.....</b>	<b>45</b>
3.1. La testostérone .....	45
3.2. L'oestradiol.....	46
3.3. La 11-Ketotestostérone.....	47
<b>4. Les indicateurs de stress .....</b>	<b>48</b>
4.1. Le glucose.....	48
4.2. L'osmolarité.....	50
4.3. Le cortisol.....	52
<b>5. Les indicateurs immunitaires .....</b>	<b>54</b>

5.1. <i>Les lymphocytes</i> .....	54
5.2. <i>L'activité des leukocytes phagocytaires</i> .....	56
5.3. <i>Le lysozyme</i> .....	58
<b>Discussion</b> .....	<b>60</b>
1. <b>Influence de l'atrazine sur la reproduction du carassin doré</b> .....	<b>60</b>
2. <b>Influence de l'atrazine sur les paramètres inhérents au stress</b> .....	<b>62</b>
3. <b>Influence de l'atrazine sur le système immunitaire du carassin doré</b> .....	<b>63</b>
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>65</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>67</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>79</b>



Première partie

## **Introduction**



# Introduction

## 1. L'atrazine

### 1.1. Introduction

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-*s*-triazine) est un herbicide sélectif de la famille des triazines commercialisé de par le monde sous différents noms (Atrataf, Crisazina, Flotrazine, Gesaprim,...). L'atrazine fut utilisée pour la première fois à la fin des années 50 et connut un succès croissant auprès des agriculteurs, de sorte qu'aujourd'hui il s'agit d'un des herbicides les plus pulvérisés sur le globe, à raison de 70 à 90 mille tonnes par an (Graymore *et al.*, 2001). La plupart du temps, l'atrazine est utilisée en agriculture comme herbicide pré-et post-émergence afin de contrôler la croissance des plantes grasses annuelles dans les cultures de céréales, maïs, asperge, citron, canne à sucre, vigne... En effet, l'atrazine inhibe la photosynthèse et accélère la métabolisation des nitrates en nitrites et ammonium.

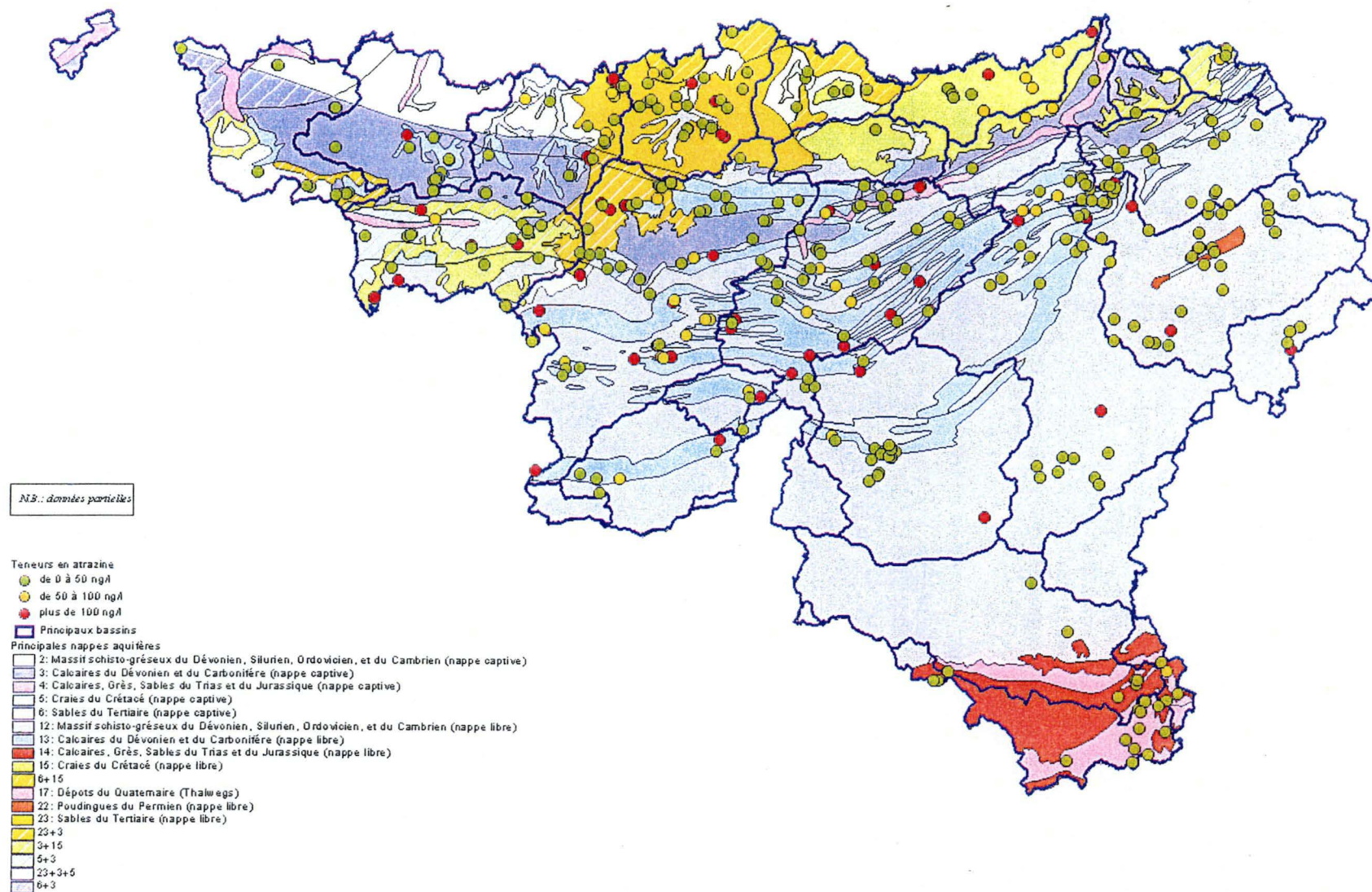
Aux Etats-Unis, l'Agence pour la Protection de l'Environnement (EPA) a estimé que 31 à 35 mille tonnes d'atrazine (forme active) ont été utilisées annuellement dans l'agriculture céréalière en 1987, 1993 et 1995 (IARC, 1999) à raison d'un taux d'application de 3,4 kg/ha. Parallèlement, l'EPA a fixé le maximum de résidus d'atrazine dans l'eau potable à 0,3µg/l.

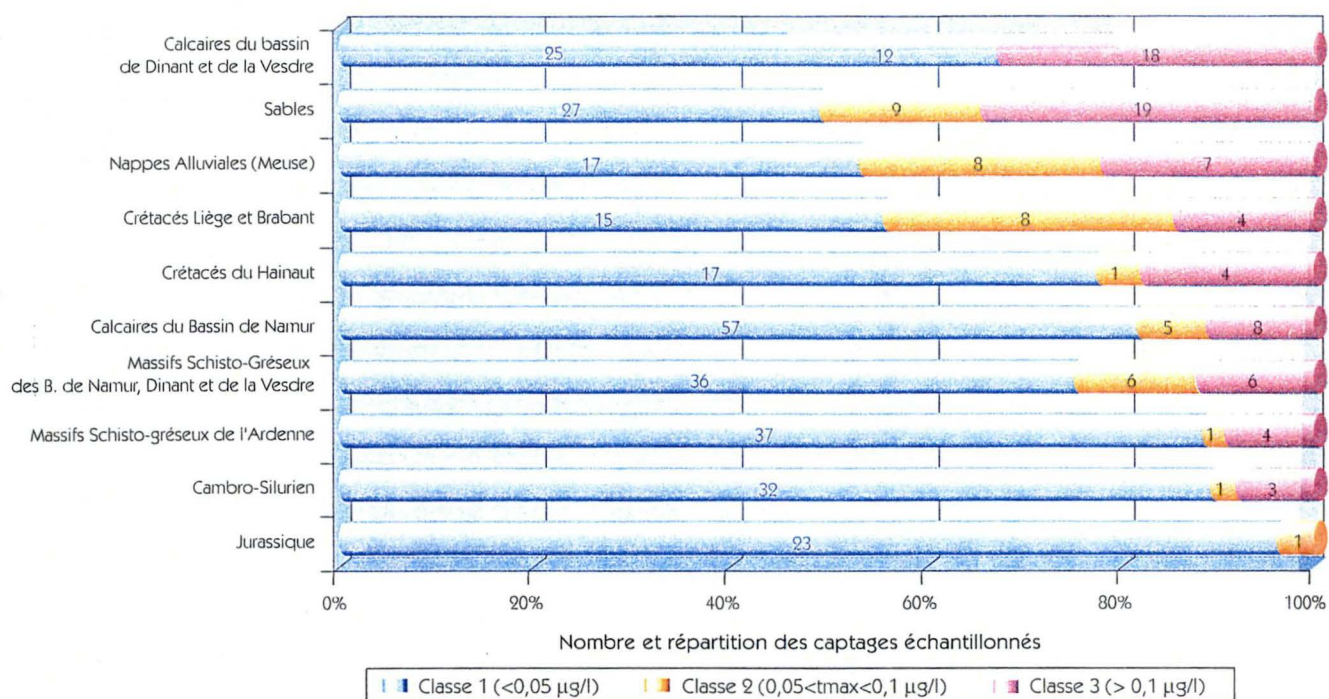
En Europe, l'usage des herbicides en général et de l'atrazine en particulier reste fort intensif. Depuis 1980 (Drinking water directive 80/778/CEE), le législateur européen a fixé la concentration maximale de pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine à 0,1µg/l par substance individualisée, avec un total maximal de 0,5µg/l pour l'ensemble des substances (Ministère de la Région Wallonne, 2000).

Par ailleurs, bien qu'ayant réussi à diminuer l'utilisation des herbicides dans l'agriculture, la Belgique reste le mauvais élève européen. En 1995, 140 tonnes d'atrazine ont été déversées dans notre pays. De plus, l'atrazine est la seule substance qui contamine les nappes phréatiques de manière générale et non ponctuelle en région wallonne : au moins 60% des contaminations, tous pesticides confondus, sont dues à l'atrazine (Ministère de la Région Wallonne, 2000). La carte et le tableau ci-joints (figure 1.1 et figure 1.2) montrent les teneurs maximales observées pour les principales nappes et localisent les captages où la concentration en atrazine a dépassé au moins une fois la concentration maximale admissible. Globalement et dans la limite de l'indicateur, on constate que le pourcentage de sites touchés est de 18% (Ministère de la Région Wallonne, 2000).

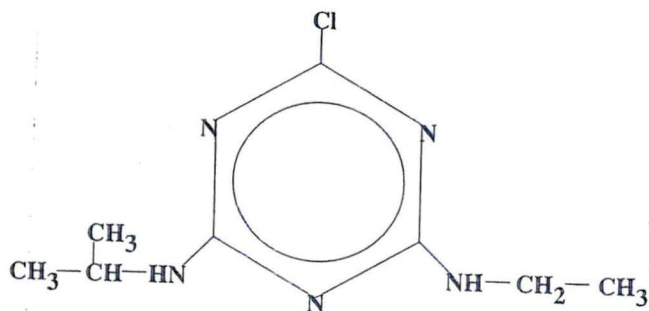


**Figure 1.1.** Sensibilité des eaux potables potabilisées vis-à-vis de l'atrazine, teneurs maximales observées entre 1993 et 1999 (Ministère de la Région Wallonne, 2000).





**Figure 1.2.** Concentration de pesticides dans les eaux souterraines en région wallonne : teneur maximale observée par captage pour l'atrazine dans la période 1993-1998 (Ministère de la Région Wallonne, 2000).



**Figure 1.3.** Structure chimique de l'atrazine (2-chloro-4-éthyl-amino-6-isopropylamino-s-triazine) (Snedeker *et al.*, 1999).



## 1.2. Comportement dans les masses d'eau

### 1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques

Les herbicides chloro-*s*-triazine, dont l'atrazine fait partie (figure 1.3), se caractérisent par un anneau hétérocyclique sur lequel on trouve trois atomes d'azote en position symétrique, un atome de chlore et deux substituants N-alkyl (Donati et Funari, 1993).

L'atrazine se caractérise par une solubilité modérée dans l'eau (33µg/l à 20°C), mais celle-ci augmente fortement dans les solvants organiques. L'anneau *s*-triazine est particulièrement résistant à la dégradation, ce qui confère à la molécule une grande stabilité et lui permet de persister plus longtemps dans différents environnements. Parallèlement, les valeurs de la DT50 de l'atrazine se situent entre 60 et 150 jours.

**DT50** : temps qu'il faut aux différents processus de dégradation pour diminuer de moitié la concentration initiale d'une substance dans un environnement donné.

### 1.2.2. Entrée dans les masses d'eau

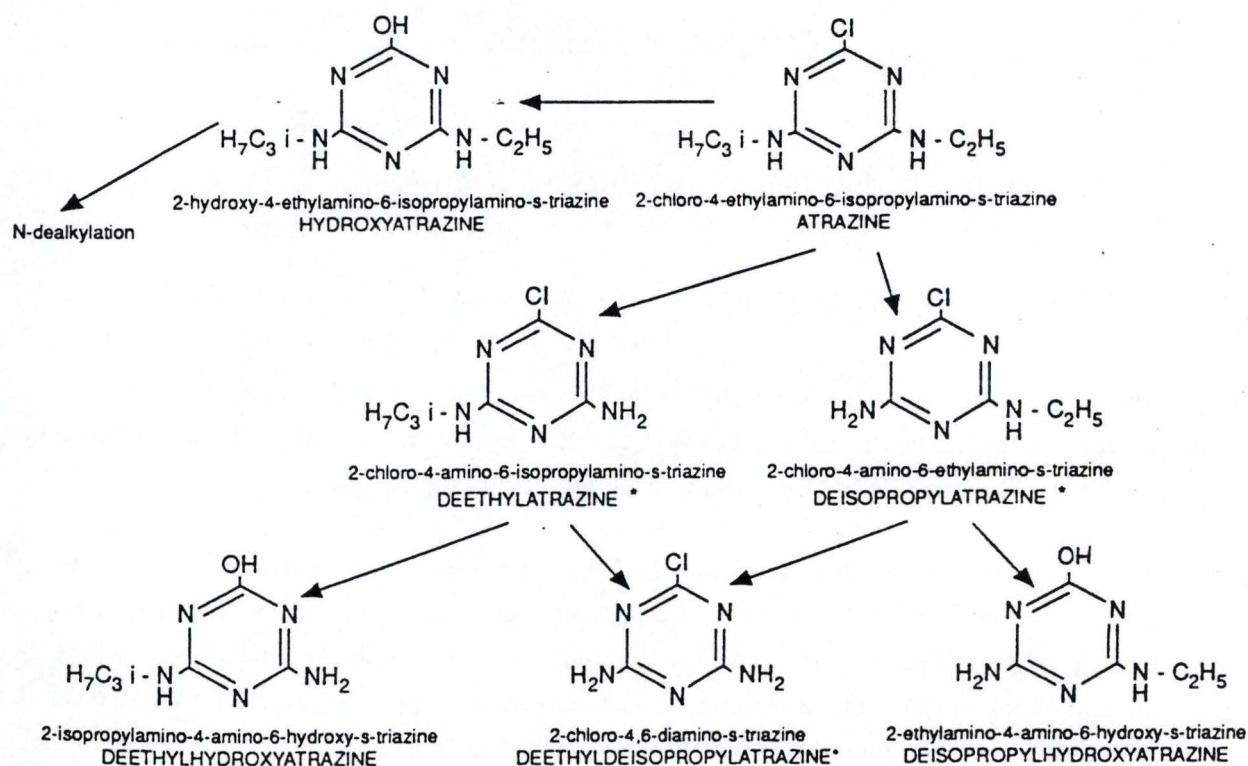
L'atrazine est généralement introduite dans l'environnement par application sur le sol. La contamination des eaux de surface est le résultat de phénomènes d'écoulement qui suivent les précipitations ou l'irrigation. La perte en herbicide tourne dans ce cas autour de 18% du volume total d'atrazine pulvérisé. La perte moyenne est cependant inférieure à 3% (Huber,1993). L'arrivée de l'herbicide dans les milieux aquatiques peut aussi dépendre de déversements irresponsables, mais aussi d'un phénomène de retombée atmosphérique par contamination de l'eau de pluie. A l'égard de ce dernier point, quelques chiffres ont été avancés : l'atrazine a été détectée dans l'air ambiant de la région parisienne en 1992 à la concentration approximative de 0,03ng/m<sup>3</sup>, la concentration maximale du total des retombées atmosphériques en eau de pluie à Paris était de 350ng/l (Chevreuil *et al.*,1996).

### 1.2.3. Dégradation et persistance de l'atrazine

#### A. Dégradation de l'atrazine

Dans l'environnement, l'atrazine peut être dégradée (figure 1.4) selon trois processus (Huber,1993) :





**Figure 1.4.** Voies de dégradation de l'atrazine dans le sol (Donati et Funari, 1993).

Study	$t_{1/2}$ (d)	Conditions
Laboratory hydrolysis studies		
Li and Feldbeck [12]	244	25°C, pH 4
	1.73	25°C, pH 4, 2% humic acid
Khan [13]	34.8	pH 2.9, 5 mg/L fulvic acid
	174	pH 4.5, 5 mg/L fulvic acid
	398	pH 6.0, 5 mg/L fulvic acid
	742	pH 7.0, 5 mg/L fulvic acid
Ciba [11]	No change after 30 d	pH 5-7
Aqueous photolysis studies		
Burkhead and Guth [15]	1	15°C, 290 nm
	0.2	15°C, 290 nm, 1 ml/L acetone
Jones et al. [16]	15-20	Aerobic, natural light, estuarine sediment
	3-12	Aerobic, natural light, estuarine water
Ciba [11]	335	pH 7, natural light
	0.73	pH 7, mercury lamp

**Tableau 1.2.** Temps de demi vie de l'atrazine dans les systèmes aquatiques (SETAC, 1996).

- par hydrolyse : via ce procédé, un groupement hydroxyl se substitue à l'atome de chlore ce qui provoque la formation d'hydroxyatrazine ;
- par N-dealkylation au niveau du carbone 4 (séparation du groupement éthyl) ou au niveau du carbone 6 (séparation du groupement isopropyl) : ce second procédé permet la formation de deux métabolites, la deethylatrazine et la deisopropylatrazine ;
- par un mécanisme de clivage de l'anneau triazine : il s'agit d' un processus habituellement utilisé par les micro-organismes.

La photodégradation, l'oxydation, ainsi que d'autres procédés, peuvent également intervenir.

Comme illustré précédemment, la dégradation de l'atrazine donne lieu à différents métabolites possédant chacun des caractéristiques spécifiques qui, dans certains cas, peuvent être similaires ou différentes par comparaison à la molécule mère (tableau 1.1).

**Tableau 1.1.** Caractéristiques de l'atrazine et ses différents métabolites d'après les données de Donati et Funari, (1993).

Molécule	DT50 (j)	Solubilité (mg/l)	Phytotoxicité
Atrazine	60-150	33	très phytotoxique
DIA	17	208	5fois moins toxique
DEA	26	375	toxicité égale
DEDIA	19	-	pas phytotoxique
Hydroxyatrazine	121	47	pas phytotoxique

**DIA** : Deisopropylatrazine ; **DEA** : Deethylatrazine ; **DEDIA** :Deethyldeisopropylatrazine.

### *B. Persistance de l'atrazine*

Dans le point précédent, nous avons mis en évidence les différents processus à la base de la dégradation de l'atrazine. La dégradation des herbicides est généralement un procédé complexe impliquant des réactions biotiques et abiotiques, mais plusieurs études démontrent



que la dégradation chimique est plus importante que la biodégradation dans le sol et dans l'eau (Donati et Funari, 1993).

Différents facteurs environnementaux peuvent influencer les processus de dégradation abiotiques et donc favoriser ou diminuer l'élimination de l'atrazine dans le milieu considéré :

- une augmentation de température dans le milieu s'accompagne d'une augmentation de l'hydrolyse ;
- pour des niveaux de pH acides et basiques l'hydrolyse se fait plus rapide alors qu'elle diminue à pH neutre. Notons que le pH peut aussi intervenir de façon indirecte en modifiant les mécanismes d'adsorption et donc la disponibilité de la molécule sous sa forme active dans le milieu ;
- l'anaérobiose favorise la persistance de l'atrazine par une diminution de l'oxydation ;
- la décomposition est aussi influencée par la composition chimique de l'eau. Un taux de salinité élevé accélère l'hydrolyse et favorise donc l'élimination de l'atrazine ;
- la photolyse de l'herbicide n'a pas lieu dans les eaux où la longueur d'onde de la lumière est supérieure à 300 nm ;
- la présence d'acides organiques (acides humiques et fulviques) accélère nettement l'hydrolyse ce qui laisse à penser que ce processus pourrait être catalysé.

L'influence de ces différents facteurs explique que le temps de résidence de l'atrazine (tableau 1.2) peut varier fortement en fonction des conditions physico-chimiques du milieu considéré. Le temps de demi-vie de l'atrazine, mesuré en milieu naturel, est globalement de 60 jours dans l'eau et de 85 jours dans les sédiments (Ordelman, 1993).

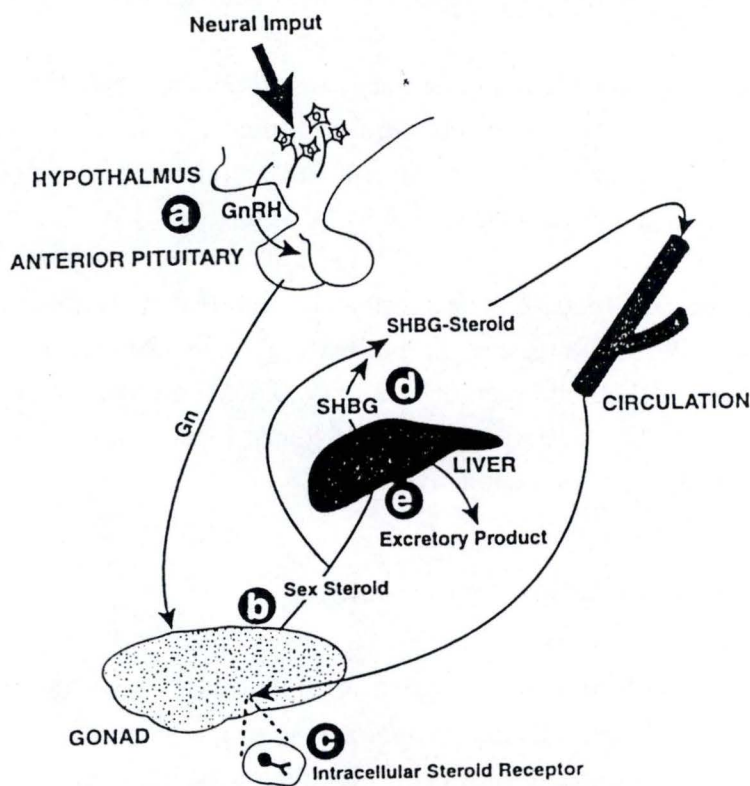
Notons aussi que l'atrazine est modérément à fortement mobile dans le sol et dans l'eau étant donné qu'elle est peu fixée par l'argile et la matière organique. Akkanen *et al.*, (2001) ont montré par leur étude que la matière organique dissoute (DOM) ne fixe que très peu l'atrazine et de par ce fait, que la concentration en DOM dans l'eau n'affecte que très peu la concentration en atrazine biologiquement active.

#### 1.2.4. Bioamplification de l'atrazine

La bioamplification de l'atrazine dans la chaîne alimentaire des milieux aquatiques est un processus peu important. Deux niveaux trophiques ont été étudiés (algue > daphnie et daphnie > poisson chat). La contribution de l'accumulation de l'atrazine dans la nourriture n'était pas, pour les deux niveaux trophiques, plus élevée que 10% (Ellgehausen *et al.*, 1980).

Species	BCF
Bluegill sunfish	12
Bluegill sunfish	<2.1
Whitefish fry	4-5
Brook trout	<0.27
Fathead minnows	<2.1
Fathead minnows	0.9
Mottled sculpin	2.0
Golden ide	1.0
Black bullhead	0.3
Fish	11
Bullfrog tadpoles	Not detectable
Annelids	4
Mayfly nymphs	480
Freshwater snail	4-5
Snails	7.5
Daphnids	2.2-4.4
Algae	76
Soil fungi and bacteria	87-132

**Tableau 1.3.** Valeurs de BCF de l'atrazine chez différentes espèces animales ( SETAC, 1996).



**Figure 1.5.** Illustration des cinq différents modes d'action des EDCs au niveau de la régulation de la synthèse des stéroïdes sexuels : (a) axe hypothalamo-hypophysaire, (b) stéroïdogénèse ovarienne, (c) récepteurs stéroïdiens, (d) production des globulines de transport et interaction avec les ligands, (e) métabolisme hépatique des stéroïdes, (Crain, 1997).



### 1.3. Caractère toxique de l'atrazine

#### 1.3.1. Bioconcentration de l'atrazine

L'effet néfaste d'un toxique sera d'autant plus important que celui-ci possède la capacité de s'accumuler dans les différents tissus d'un organisme. En effet, la bioconcentration permet de concentrer le toxique à l'intérieur de l'organisme et donc de soumettre ce dernier à une dose plus élevée que celle mesurée dans le milieu de vie.

On caractérise la capacité de bioconcentration d'un toxique chez une espèce animale par le calcul du facteur de bioconcentration (BCF) qui définit le rapport entre la quantité de toxique présente dans le milieu interne (organe) et la concentration en toxique présente dans le milieu externe (Gluth *et al.*, 1985).

$$\text{BCF} = [\text{toxique}]_{\text{organisme}} / [\text{toxique}]_{\text{eau ou sol}}$$

Chez le poisson (tableau 1.3), le BCF de l'atrazine est assez faible et se trouve en dessous de 10. Gluth *et al.*, (1985) ont montré que chez la carpe commune *Cyprinus carpio* Linnaeus (1758), le BCF de l'atrazine est le même pour le sang, les branchies et les muscles et vaut 1, tandis que le BCF du foie, des intestins et des reins se situe entre 2 et 4. Cette faible capacité de bioconcentration de l'atrazine chez le poisson traduit l'efficacité des processus de détoxification de phase 1 et de phase 2 du foie. Dans un premier temps (phase 1), les monooxygénases de la famille du CYP450 oxydent le toxique, ce qui le rend plus polaire. Dans une seconde étape (phase 2), le composé oxydé est complexé à divers produits. Dans le cas spécifique de l'atrazine, c'est la glutathione *S*-transférase qui catalyse le couplage entre le toxique et le glutathion. De ces deux étapes découle un complexe atrazine-glutathion hydrophile qui peut être facilement excrété par l'organisme.

Notons que le caractère peu lipophile de l'atrazine est un second facteur limitant son accumulation au niveau des tissus graisseux.

#### 1.3.2. Toxicité de l'atrazine

On peut définir la toxicité comme étant une particularité d'une substance donnée dont l'absorption par un organisme a pour effet de perturber le métabolisme, entraînant ainsi des troubles physiologiques pouvant mener à la mort de l'individu exposé.



On distingue deux types de toxicité :

- la toxicité aiguë, qui décrit les effets néfastes résultant d'une exposition à court terme (quelques jours) mais à forte dose et pouvant entraîner jusqu'à la mort de l'organisme intoxiqué ;
- la toxicité chronique, qui caractérise pour sa part les effets néfastes dus à une exposition prolongée (quelques semaines à quelques mois) mais à dose plus faible. Dans ce dernier cas, la manifestation des dommages engendrés par le toxique chez l'organisme peut apparaître bien après l'exposition.

La toxicité aiguë d'un composé peut se caractériser par le calcul de différents paramètres que sont la **DL50**, la **CL50**, la **DL10** et la **DL90**.

- **DL50**: dose létale d'un toxique qui engendre une mortalité de 50% au sein de la population exposée après un temps d'exposition  $t$  défini.
- **CL50** : même chose que DL50 mais dans le cas d'un composé volatil.
- **DL10** : dose d'un toxique pour laquelle on observe moins de 10% de mortalité au sein de la population exposée après un temps d'exposition  $t$  défini. Cette mesure permet de définir une limite entre toxicité aiguë et chronique.
- **DL90** : dose d'un toxique qui entraîne 90% de mortalité au sein de la population exposée après un temps d'exposition  $t$  défini.

Le tableau 1.4 illustre quelques valeurs de CL50 ( $\mu\text{g/l}$ ) de l'atrazine pour différentes espèces de poisson d'eau douce.

**Tableau 1.4.** Valeurs de CL50 ( $\mu\text{g/l}$ ) de l'atrazine pour différentes espèces de poisson d'eau douce.

Espèce	CL50 ( $\mu\text{g/l}$ )	Durée (h)	Référence
<i>Onchorynchus mykiss</i>	4,500-11,000	96	Huber, 1993
<i>Cyprinus carpio</i>	19 ,000	96	Huber, 1993
<i>C. carpio</i>	41 ,000	24	Neskovic' <i>et al.</i> , 1993
<i>C. carpio</i>	41 ,000	48	Neskovic' <i>et al.</i> , 1993
<i>C. carpio</i>	18 ,800	96	Neskovic' <i>et al.</i> , 1993
<i>Carassius carassius</i>	76 ,000	96	SETAC, 1996
<i>Carassius auratus</i>	>10 ,000	48	SETAC, 1996
<i>Salvelinus fontinalis</i>	6 ,300	96	SETAC, 1996

A l'heure actuelle, on utilise d'autres paramètres pour caractériser les effets délétères d'un toxique sur un type d'organisme donné. En effet, les marqueurs histopathologiques sont des intermédiaires reflétant une altération moléculaire, biochimique et/ou histologique induite par un toxique (Hinton,1997).

**Tableau 1.5.** Résultats des expériences de Braunbeck *et al.*, (1994) et Oulmi *et al.*, (1995) concernant les effets toxiques de l'atrazine sur le système rénal et hépatique de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et ce en contamination chronique. Les individus sont exposés à des doses de 10, 20, 40, 80, 160 µg/l d'atrazine et ce pendant une période de cinq semaines.

Organite	Effet	Hépatocytes	TCP1	TCP2	TCD
Noyau	contours irréguliers	80µg/l	20µg/l	20µg/l	-
	↗ hétérochromatine	-	20µg/l	-	-
	↗ activité mitotique	160µg/l	-	-	-
	↗ cellules binuclées	160µg/l	-	-	-
	↗ nuclei	160µg/l	-	-	-
Mitochondrie	formes atypiques	40µg/l	10µg/l	10µg/l	20µg/l
	mitochondrie géante	-	10µg/l	10µg/l	20µg/l
	forme en anneau	-	-	10µg/l	-
	cristaux longitudinaux	-	80µg/l	10µg/l	80µg/l
	myéline intra-mitochondriale	160µg/l	10µg/l	10µg/l	-
Peroxisome	élongation longitudinale	40µg/l	-	-	-
	prolifération	-	80µg/l	10µg/l	-
Rer	formation de grappes	-	80µg/l	10µg/l	-
	fragmentation	40µg/l	20µg/l	10µg/l	-
	dégranulation	-	20µg/l	10µg/l	-
	dilatation	40µg/l	-	-	-
	vésiculation	40µg/l	-	-	-
Rel	réduction	160µg/l	-	-	-
	prolifération et dilatation	160µg/l	10µg/l	-	-
Golgi	fragmentation	-	-	10µg/l	-
	↗ hétérogénéité	-	-	20µg/l	20µg/l
	fenestration	-	10µg/l	10µg/l	20µg/l
	hypertrophie	-	20µg/l	-	-
	dilatation des vésicules	-	-	20µg/l	20µg/l
Lysosome	prolifération et ↗ taille	80µg/l	20µg/l	-	-
	autres espèces	40µg/l	-	-	-

TCP1: partie initiale du tube proximal; TCP2: partie terminale du tube proximal; TCD: tube contourné distal

Paramètres non communs au foie et aux reins:

#### Reins:

- Invasion des macrophages dans les cellules dès 20µg/l
- Bordure en brosse: apparition de cryptes et augmentation des vésicules au niveau du TP1 dès 10µg/l

#### Foie:

- Diminution du glycogène dans les cellules dès 40µg/l
- Perturbation de la compartimentation intra-cellulaire dès 40µg/l
- Invasion de macrophages dès 40µg/l; Augmentation de la phagocytose du glycogène dès 80µg/l
- Migration des granulocytes dès 40µg/l



Les travaux de Braunbeck *et al.*, (1994), ont mis en évidence des marqueurs histologiques permettant de caractériser l'intoxication chronique de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (1792) à l'atrazine. Pour ce faire, différents lots de poissons ont été soumis à des doses de 0, 10, 20, 40, 80 et 160 µg/l d'atrazine pendant cinq semaines. Les effets délétères sont observés aux niveaux du foie (hépatocytes) et du néphron (tube contourné proximal et distal) (tableau 1.5).

Au niveau du tube contourné proximal, les effets se marquent dès les faibles doses (10, 20 µg/l) et l'intensité de ceux-ci est plus faible au niveau du tube contourné distal. En ce qui concerne les hépatocytes, on peut mettre en évidence des délétions au niveau de nombreux organites mais celles-ci apparaissent pour des doses en atrazine plus élevées (40, 80 et 160 µg/l). En outre, la prolifération des peroxisomes et lysosomes semble être un indicateur spécifique d'une contamination chronique à l'atrazine.

Neskovic' *et al.*, (1993), ont étudié l'impact d'une intoxication chronique à l'atrazine chez la carpe commune. Les poissons sont soumis pendant 14 jours à 0 ; 1,5 ; 3 et 6 mg/l d'atrazine. Les effets du toxique sont observés aux niveaux des branchies et de l'intestin. Dès 1,5 mg/l, on observe sur les branchies une hyperplasie des cellules épithéliales. Une réduction de la taille ainsi qu'une fusion des lamelles branchiales s'observent pour une concentration de 6mg/l. Au niveau de l'intestin, les changements sont mineurs : on observe une petite infiltration lymphocytaire ainsi qu'une augmentation de la sécrétion mucale.

Signalons aussi que différentes études mettent en évidence un effet toxique important de l'atrazine sur le phytoplancton et les macrophytes d'eau douce. Par ailleurs, des effets carcinogènes de l'atrazine sont connus chez le rat, mais ces résultats ne permettent pas d'avancer, selon l'EPA, un effet carcinogène de l'atrazine chez l'homme.

## 2. Effets des polluants sur le système reproducteur : la perturbation endocrinienne chez le poisson

### 2.1. Introduction

C'est la publication en 1962 du livre de Rachel Carson " *Le printemps silencieux* " qui attira pour la première fois l'attention du public sur les effets néfastes que peut entraîner l'utilisation massive de pesticides sur le milieu naturel (Kime, 1998). Carson se focalisa alors sur un groupe de substances qui, par leur capacité de résistance à la dégradation chimique et biologique, persistaient dans l'environnement et se retrouvaient en fortes concentrations dans l'ensemble de la chaîne alimentaire, provoquant ainsi une contamination à forte dose pour les



espèces à haut niveau trophique (Solomon, 1998). Dès la publication du livre de Carson, des actions ont été menées par différents pays industrialisés pour limiter l'usage de substances néfastes comme par exemple le dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT). Mais la résolution d'un problème en soulève souvent un autre. Ce fut le cas avec les perturbateurs endocriniens et leurs effets néfastes sur la nature et l'homme.

Actuellement, il est admis que certains produits chimiques possèdent une capacité de modulation du système endocrinien et, de ce fait, une capacité d'interférence avec les processus naturels de développement et de reproduction (Arukwe, 2001).

Etant donné que l'environnement aquatique constitue le réceptacle ultime pour la majorité de ces produits chimiques et leurs métabolites, il semble normal que la majorité des exemples de perturbation endocrinienne bien documentés concerne les différentes espèces animales vivant dans ces milieux (Sumpter, 1998).

## 2.2. Généralités de la perturbation endocrinienne

### 2.2.1. Définitions

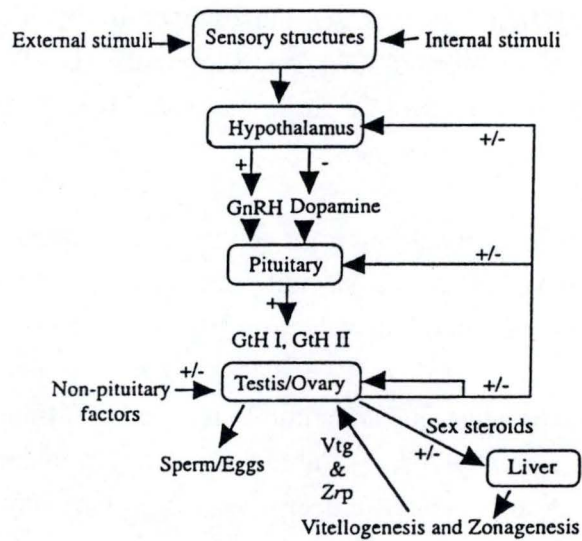
Pour Crain (1997), un perturbateur endocrinien se définit comme étant un contaminant qui modifie de façon permanente ou temporaire la morphologie ou la fonction d'un tissu, et ce comme résultat d'une exposition pendant une période sensible du développement.

Pour Kavlocks *et al* (1996), un perturbateur endocrinien est un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison et l'élimination des hormones naturelles dans les compartiments du corps responsables de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement.

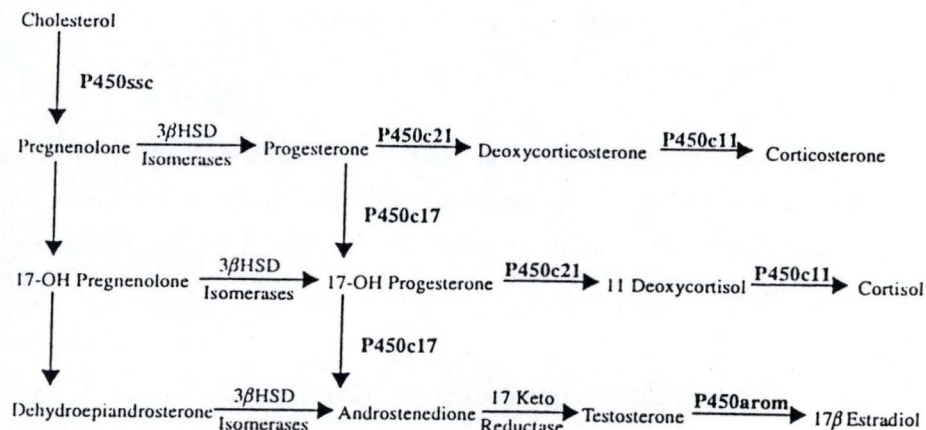
Enfin, Vos *et al* (2000) définissent un perturbateur endocrinien comme une substance exogène ou un complexe de substances qui altère le fonctionnement du système endocrinien, et qui a donc pour conséquence de provoquer des effets néfastes sur la santé d'un organisme sain, sur sa progéniture ou sur la population.

### 2.2.2. Modes d'action des perturbateurs endocriniens

Le mode d'action exacte des perturbateurs endocriniens n'est pas encore bien connu. Cependant, de nouvelles recherches ont permis de comprendre que ce mécanisme est plus compliqué que celui escompté (Arukwe, 2001). Les contaminants peuvent perturber le système endocrinien (figure 1.5) en altérant :



**Figure 1.6.** Mode de régulation schématique de la reproduction chez le poisson : (+) stimulation, (-) inhibition. GnRH = gonadotropin releasing hormone ; GtH = gonadotropin 1 et 2; Vtg = vittelogénine; Zr-p = protéine Zr, (Arukwe,2001).



**Figure 1.7.** Synthèse des stéroïdes sexuels associée à l'action d'enzymes spécifiques. **P450ssc**, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 ; **3βHSD**, 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase-isomérase; **P450c21**, P-450 21α-hydroxylase; **P450c11**, P-450 11α-hydroxylase; **P450c17**, P-450 17α-hydroxylase ; **17 Keto Reductase** = **17β-HSD**, 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; **P450arom**, cytochrome P-450 aromatase, (Crain,1997).



- le contrôle endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire ;
- l'activité des enzymes intervenant dans la stéroïdogenèse ;
- le fonctionnement et la synthèse des protéines de transport des stéroïdes, comme par exemple les globulines de transport (sex hormone binding globulins : SHBGs) ;
- l'activité des récepteurs hormonaux, en agissant comme agoniste ou antagoniste par rapport à l'hormone naturelle ;
- la fonction d'élimination des stéroïdes au niveau du foie.

#### *A. Perturbation de l'axe hypothalamo-hypophysaire*

##### *Rappel de la régulation de la reproduction par l'axe hypothalamo-hypophysaire :*

L'hypothalamus est responsable de la neurosécrétion de la gonadotropin releasing hormone (GnRH) qui ensuite, stimule la production des gonadotropines (GtH1 et GtH2) par l'adénohypophyse. Ces deux glycoprotéines sont alors libérées dans le système circulatoire et viennent stimuler la production des stéroïdes sexuels (17 $\beta$ -oestradiol, testostérone et 11-Ketotestosterone) aux niveaux des ovaires et testicules. Cette stimulation entraîne l'activation du processus de maturation chez les juvéniles ou de la reproduction chez les individus adultes. Chez un animal normal, la sécrétion de la GtH1 et GtH2 est régulée par un mécanisme de feedback (Figure 1.6).

Les altérations au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire peuvent être de natures diverses (tableau 1.6 et tableau 1.7).

Crain (1997) reporte que le chlorodimeforme, un acaricide, a pour effet chez le rat de diminuer la concentration de GtHs dans le sérum sanguin, et ce en provoquant une désensibilisation des récepteurs adrénergiques de l'hypothalamus par augmentation de la sécrétion de norépinéphrine.

L'hypophyse peut aussi subir des altérations. Kime (1998), reporte que le  $\beta$ -hexachlorocyclohexane provoque la sécrétion des GtHs pituitaires et possède un effet oestrogénique qui se marque par un retard dans la croissance testiculaire chez les mâles. Ces altérations ont pour effet de moduler tout le processus de régulation hormonal de la reproduction.

#### *B. Altération des enzymes intervenant dans la stéroïdogenèse*

La synthèse des stéroïdes sexuels commence par le cholestérol qui, via les différentes enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse, évolue en progestagènes, androgènes et œstrogènes (figure 1.7).

**Tableau 1.6. Effets des EDCs sur l'hypothalamus**

Polluant	Espèce	Dose	Temps	Effet	Référence
Chlorure de mercure	<i>Channa punctatus</i>	0,01mg/l	6 mois	Nécroses cellulaires et nucléaires	Ram et Joy, 1988
Emisan	<i>Channa punctatus</i>	0,2mg/l	6 mois	Domages aux cellules neurales nécrose des noyaux	Ram et Sathyanesan, 1987
Cyanide	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	0,01mg/l	12 jours	Augmentation de la sécrétion de dopamine, diminution de la synthèse de GtH et diminution du développement des gonades	Szabo <i>et al.</i> , 1991

**Tableau 1.7. Effets des EDCs sur la glande pituitaire**

Polluant	Espèce	Dose	Temps	Effet	Référence
Cyanide	<i>Jordenella floridae</i>	0,065 - 0,087 mg/l	fécondation - éclosion	Réduction de la taille de la glande, retard de la maturité sexuelle, 30% d'œufs pondus en moins, période de reproduction courte	Cheng et Ruby, 1981
Emisan	<i>Channa punctatus</i>	0,2mg/l	6 mois	Réduction de la synthèse des Gths, réduction activité des GtHs, réduction activité gonadale	Ram et Joy, 1988



Une variation de l'induction ou de la répression des gènes codant pour les différentes enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse peut mener à une production anormale en hormones (Crain, 1997). On suppose notamment que l'atrazine agirait en ce sens chez l'alligator américain *Alligator mississippiensis* Daudin (1801). En effet, Crain *et al* (1999) reportent qu'une augmentation de l'activité de l'aromatase se produit chez des alligators mâles soumis à une dose de 14ppm d'atrazine mais que, chez ces mêmes individus, aucune variation morphologique significative n'est observée au niveau du tractus génital.

### C. Altération des protéines de transport

Une fois dans le sérum sanguin, les hormones stéroïdiennes se déplacent vers les tissus cibles grâce à un couplage avec différentes protéines de transport spécifiques, les SHBGs. A ce niveau, on peut définir deux types d'altération par les perturbateurs endocriniens (endocrine disrupting chemicals : EDCs).

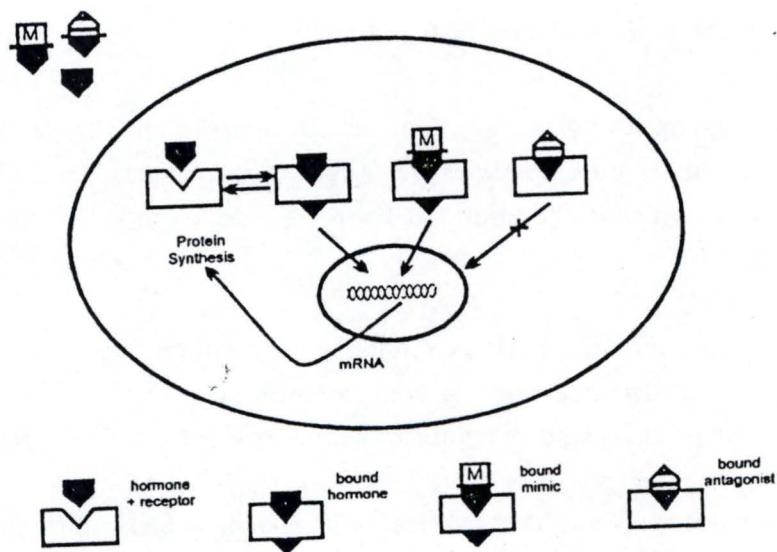
Premièrement, une augmentation des SHBGs circulantes provoque une prolifération des complexes hormone-SHBG et diminue donc la concentration en hormones biologiquement actives ; ce qui provoque un effet antiandrogénique ou antioestrogénique (Crain, 1997).

Deuxièmement, les toxiques agissant comme les oestrogènes et les androgènes ont la possibilité de se fixer aux SHBGs. Ceci a pour effet d'augmenter l'élimination des hormones naturelles par le foie et les reins et par ce fait, de diminuer leur concentration dans le sang (Van Der Kraak *et al.*, 1998). Certains EDCs tels l'octylphenol, l'*o,p'*-DDT et le diethylstilbesterol (DES) ont la possibilité d'agir en ce sens.

### D. Fixation à un récepteur spécifique : agonisme et antagonisme

Etant donné leur nature lipidique, les stéroïdes diffusent passivement au travers des membranes plasmiques. Une fois à l'intérieur de la cellule, ils se fixent à un récepteur spécifique et le complexe hormone-récepteur induit l'activation de la transcription d'un gène codant pour une protéine spécifique. Beaucoup d'EDCs ont la possibilité de se fixer directement sur les récepteurs hormonaux (figure 1.8). Pour Van Der Kraak *et al* (1998), ce système est beaucoup plus compliqué. En effet, la réponse fournie par un EDC dépend de plusieurs facteurs que sont :

- l'affinité du EDC pour la SHBG ;
- l'affinité de l'EDC pour le récepteur nucléaire ;
- la capacité du complexe EDC-réc à reconnaître le gène ciblé et ses promoteurs ;
- et la capacité du complexe EDC-réc à recruter les différents facteurs de transcription.



**Figure 1.8.** Mécanisme d'action des hormones, agonistes et antagonistes envers les récepteurs hormonaux (Kime, 1998).



**Tableau 1.8.** Action de différents EDCs sur les récepteurs hormonaux selon les données de Vos *et al.*, (2000) et Crain (1997)

EDCs	Action	Effet
Fenorinol Cyanoketone Ketoconasol	Altération de la synthèse des oestrogènes	Antioestrogénique
<i>o,p'</i> -DDT Chlordecone 17α - éthinylestradiol	Fixation aux RE et RP	Oestrogénique
<i>p,p'</i> -DDE Métabolites du vinclozolin	Fixation au RA Empêche la réponse des cellules à la testostérone	Antiandrogénique
PCBs DDT	Fixation RE	Oestrogénique
Nonylphénol Bisphenol A	Fixation aux RE, RA et RP	Oestrogénique
RE : récepteur œstrogène, RA : récepteur androgène, RP : récepteur progestagène		

**Tableau 1.9. Effets des EDCs sur la morphologie ovarienne et le développement ovocytaire**

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Cadmium	<i>Lepidocephalichthys thermalis</i>	0,2	20	Dégénérescence de l'ovaire, perturbation de la vitellogenèse	Victor <i>et al.</i> , 1986
Aldrin	<i>Puntius conchoni</i>	0,00005	60 - 120	Augmentation de l'atrésie des ovocytes	Kumar et Pant, 1989
Chlordecone	<i>Heteropneustes fossilis</i>	0,024	60	Dégénérescence de l'ovaire	Srivastava, 1994
Endosulfan	<i>Channa striata</i>	0,00075-0,008	2 - 30	Réduction du GSI et inhibition du développement ovocytaire	Kulshrestha et Arora, 1984
Fenitrothion	<i>Channa punctatus</i>	1,5	120	Réduction du GSI, inhibition du développement ovocytaire, atrésie des ovocytes	Mani et Saxena, 1985

GSI: Indice gonadosomatique

**Tableau 1.10. Effets des EDCs sur la stéroïdogénèse ovarienne**

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Endosulfan	<i>Clarias batrachus</i>	0,0015	16	Diminution de la vitellogénine plasmatique	Chakravorty <i>et al.</i> , 1992
$\gamma$ -HCH	<i>Carassius auratus</i>	0,01 - 0,1	28	Diminution des GtHs, altération de la synthèse des stéroïdes	Singh <i>et al.</i> , 1994
	<i>Rutilus rutilus</i>	1 - 20 <i>in vitro</i>	0,12	Altération de la synthèse des stéroïdes	Singh et Kime, 1995
Cythion	<i>Clarias batrachus</i>	1 - 4	4 - 28	Diminution des stéroïdes sexuels au niveau du plasma	Singh et Singh, 1987
Methylparathion	<i>Annabas testudineus</i>	0,0001	90	Diminution des oestrogènes, diminution du GSI	Choudhury <i>et al.</i> , 1993
Phosdrin	<i>Mystus vittatus</i>	0,0001	84	Inhibition de la vitellogenèse, inhibition de la 3 $\beta$ -HSD	Haider et Upadhyaya, 1985

$\gamma$ -HCH:  $\gamma$ -Hexachlorocyclohexane



Notons qu'il existe des protéines spécifiques jouant le rôle d'intermédiaire entre le complexe hormone-récepteur et la machinerie transcriptionnelle. Les transcription intermediate factors (TIFs) sont présents au niveau du récepteur à l'androgènes et oestrogènes et ont la possibilité de reconnaître de façon spécifique le ligand de ce dernier. L'hormone ou l'EDC a donc la capacité d'influencer l'interaction TIF-réc. Le tamoxifen, par exemple, n'est pas reconnu par le TIF associé au récepteur à l'oestrogène et possède une action antioestrogénique (Van Der Kraak, 1998). Le tableau ci-joint (tableau 1.8) illustre l'action de certains EDCs sur les récepteurs hormonaux.

### *E. Altération de l'élimination des stéroïdes par le foie*

Une des fonctions hépatiques est le recyclage des stéroïdes sexuels. Cependant, les hormones sexuelles peuvent être transformées au niveau du foie en composés plus hydrophiles qui peuvent être excrétés. Une altération de la capacité d'élimination des stéroïdes par les EDCs peut dès lors altérer le profil hormonal chez un individu intoxiqué. Certains insecticides comme le parathion et le malathion inhibent l'hydroxylation de la testostérone au niveau du foie et donc son excrétion (Crain, 1997).

### 2.2.3. La perturbation endocrinienne: organisation versus activation

Les effets des perturbateurs endocriniens peuvent être classés en deux catégories : les effets organisationnels et les effets activationnels. En général, les altérations qui se produisent pendant la période allant de la ponte des gamètes jusqu'au stade juvénile sont permanentes et de nature organisationnelle (figure 1.9), se caractérisant par une altération de la morphologie tissulaire. Les altérations se produisant pendant le stade adulte et le stade de maturation sont transitoires et activationnelles, et se manifestent en perturbant la fonction physiologique (Crain, 1997).

Le stade embryonnaire est l'un des plus sensibles face à une exposition aux EDCs mais les altérations organisationnelles observées dépendent également du phylum considéré. Les deux expériences suivantes mettent en évidence cette importance du phylum.

Bergeron *et al* (1994), ont mis en évidence des effets oestrogéniques de certains polychlorobiphényles (PCBs) chez la tortue *Trachemys scripta* Schoepff (1752) en cours de développement. Une exposition à de faibles doses en PCBs provoque, chez des embryons incubés à une température donnant 100% de mâles, l'apparition d'un tissu ovarien et d'un canal de Müller.

Cooke *et al* (1996), mettent en avant les effets de PCBs chez le rat. L'exposition d'embryons à différents PCBs provoque chez l'adulte une augmentation du poids des testicules ainsi qu'une augmentation de la production du sperme.



### 2.3. *Action des polluants sur les systèmes reproducteurs femelle et mâle*

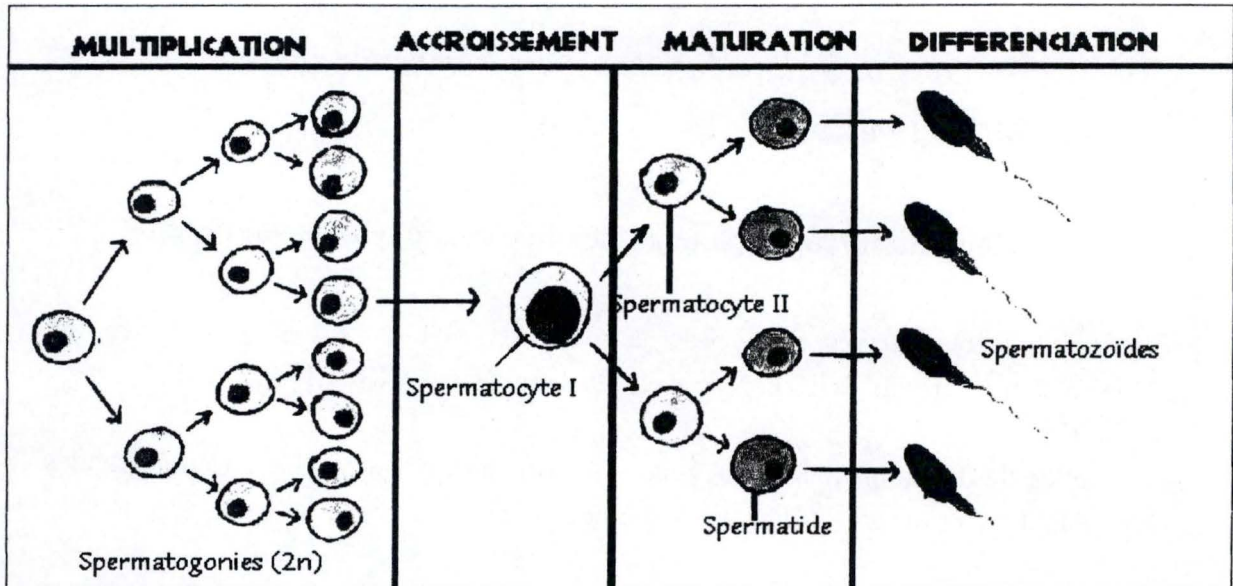
#### 2.3.1. Le système reproducteur chez le poisson téléostéen : rappel

Les poissons téléostéens arrivés en âge de la maturité sexuelle présentent un cycle de reproduction saisonnier (figure 1.10) comprenant plusieurs étapes (Kime, 1998).

Chez les femelles, le développement ovocytaire ou ovogenèse se subdivise en cinq grandes phases (figure 1.11 ; voir planche 1 dans la troisième partie) :

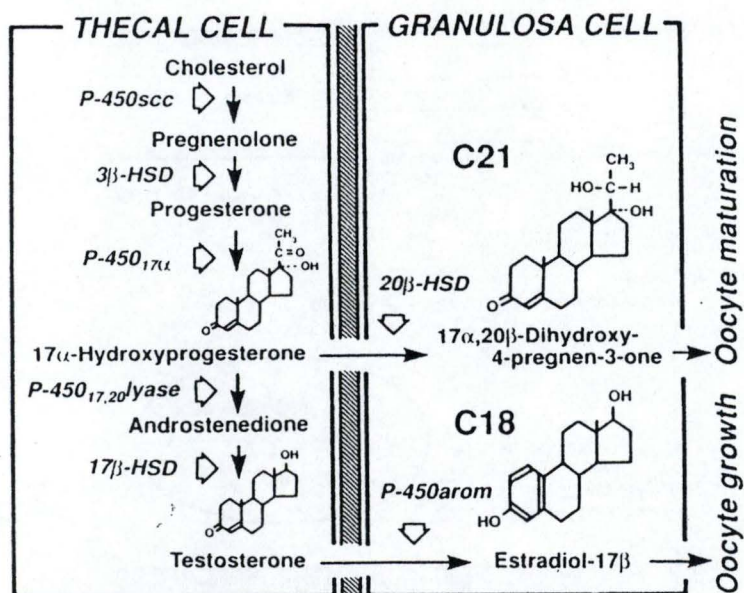
- **une phase protoplasmique** pendant laquelle on assiste à une multiplication des ovogonies par divisions mitotiques qui deviennent alors des ovocytes primaires. Les ovocytes primaires présentent des chromosomes arrêtés au stade diploïde de la prophase 1 méiotique ainsi qu'un cytoplasme dépourvu de vacuole. Notons que la phase protoplasmique ne dépend pas d'un contrôle endocrinien par l'axe hypothalamo-hypophysaire ;
- **une phase de croissance ovocytaire** nommée vittelogenèse qui est sous la dépendance des GtHs hypophysaires. La vittelogenèse comprend deux étapes importantes :
  - (a) la vittelogenèse endogène, qui caractérise une augmentation de la taille des ovocytes par une accumulation périphérique de vésicules glycoprotéiniques néosynthétisées ;
  - (b) la vittelogenèse exogène, qui se caractérise par une accumulation centrifuge de globules vitellins. Ces globules vitellins sont constitués de différentes protéines vitellines élaborées à partir d'un précurseur synthétisé par le foie, la vittélogénine (VtG) ;
- **une phase dite de maturation finale ovocytaire** durant laquelle le noyau reprend ses divisions méiotiques pour atteindre la prophase 2 et migre en périphérie de l'ovocyte. Après cette migration, la vésicule germinative se disperse et forme la germinal vesical break-down (GVBD). La phase de maturation finale est sous dépendance des GtHs hypophysaires et de certains progestagènes ;





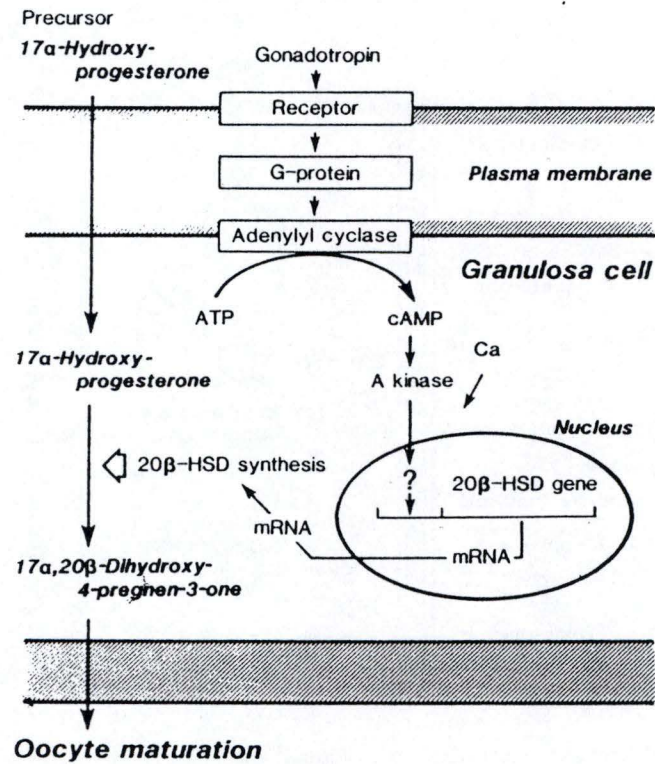
**Figure 1.12.** La spermatogenèse chez le poisson téléostéen.

Les spermatogonies diploïdes subissent une série de divisions mitotiques en vue de former les spermatocytes primaires. Ces derniers subissent la méiose 1 et donnent les spermatocytes secondaires qui, via la méiose 2, forment les spermatides. L'acquisition de la motilité rend ensuite les gamètes ou spermatozoïde aptes à la fécondation.



**Figure 1.13.** Voie de biosynthèse des stéroïdes au niveau d'un follicule ovarien durant la période de croissance et de maturation. Le schéma illustre la contribution des cellules thécales et de la granulosa dans la production du 17β-oestradiol et de la 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17α,20β-DP). **P450<sub>sc</sub>**, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450; **3βHSD**, 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase-isomérase; **P450<sub>17α</sub>**, P450 17α-hydroxylase; **17β-HSD**, 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase; **P450<sub>arom</sub>**, cytochrome P-450 aromatase, **20β-HSD**, 20β-hydroxystéroïde déshydrogénase (Sherwood et Hew, 1994).





**Figure 1.14.** Illustration présentant l'activation de la 20β-hydroxystéroïde déhydrogénase (20β-HSD) au sein des cellules de la granulosa et ce, via la formation d'AMPc (Sherwood et Hew, 1994).

- **l'ovulation** au cours de laquelle les ovocytes sont expulsés dans la cavité péritonéale. A ce stade, les ovules reprennent leur méiose jusqu'en métaphase 2, stade où la fécondation devient possible ;
- **une phase de récupération** pendant laquelle on observe une résorption des follicules postovulatoires (*corpora lutea*) restés dans l'ovaire. Notons qu'il existe aussi des phénomènes de résorption préovulatoire généralement induits par un stress environnemental.

Chez les mâles, les différentes phases du cycle reproducteur sont moins bien définies que chez les femelles (Kime,1995). Au sein des lobules ou tubules testiculaires, les spermatozoïdes sont formés à partir de spermatogonies selon un processus de développement nommé spermatogenèse (figure 1.12). Dans un premier temps, les spermatogonies se multiplient par divisions mitotiques répétées et se transforment en spermatocytes primaires. Ces derniers subissent une division réductionnelle et forment les spermatocytes secondaires ; la division des spermatocytes secondaires va produire des spermatides qui se métamorphosent ensuite en gamètes motiles et potentiellement fonctionnels, les spermatozoïdes.

La régulation du cycle de reproduction est assurée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les bases de ce système ont été mises en évidence en page 8 et illustrées par la figure 1.6. Notons cependant que les hormones gonadotropes GtH1 et GtH2 n'agissent pas de la même façon.

En effet, chez les femelles, la GtH2 est responsable de l'induction de la stéroïdogénèse ovarienne (figure 1.13), de la vittelogenèse exogène mais aussi de la maturation finale (figure 1.14) et de l'ovulation. La GtH1, quant à elle, est responsable de l'activation de la vittelogenèse endogène et permet à la vittelogénine de pénétrer dans les ovocytes.

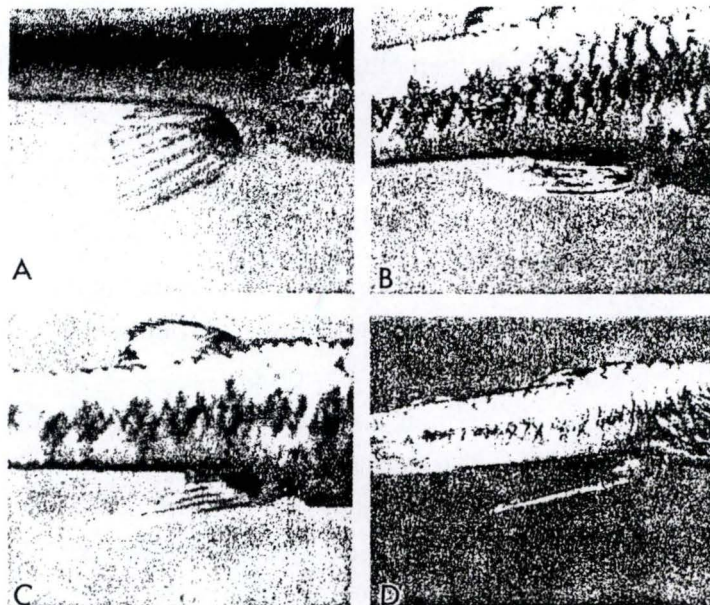
Chez les mâles, la GtH2 active la stéroïdogénèse testiculaire au niveau des cellules de Leydig qui, à son tour, est responsable de l'activation de la croissance testiculaire, de la spermatogenèse et de la spermiation.

### 2.3.2. Perturbation du système reproducteur femelle

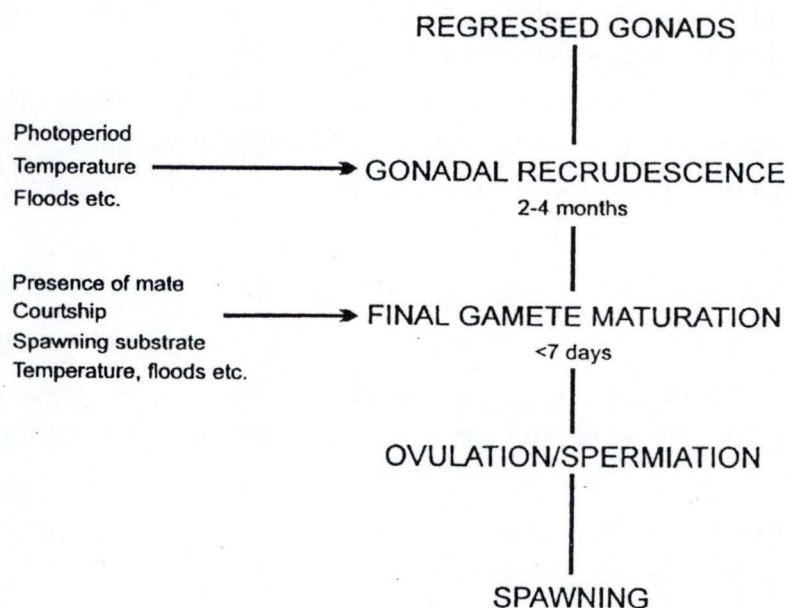
L'exposition de poissons de sexe femelle à un ou plusieurs polluants peut provoquer différentes perturbations morphologiques et physiologiques qui se manifestent principalement par :

- une perturbation de la morphologie de l'ovaire ;
- une modification de la stéroïdogénèse ovarienne ;
- un retard dans le développement des ovocytes.





**Figure 1.15.** Effet des BKMEs quant au développement d'un gonopode chez la femelle d'*Heterandia formosa* : (A) nageoire anale d'une femelle normale, (B) nageoire anale d'une femelle partiellement masculinisée, (C) nageoire anale d'une femelle en état de masculinisation avancé, (D) nageoire anale d'un mâle normal. (Kime, 1998).



**Figure 1.10.** Cycle de reproduction chez le poisson téléostéen (Kime, 1998).

### A. Altération de la morphologie ovarienne et du développement ovocytaire

De nombreuses études (tableau 1.9) ont été réalisées quant à l'action des polluants sur la morphologie des ovaires et le développement des ovocytes, et ce chez des individus adultes. Les exemples suivant nous semblent illustrer au mieux cette problématique.

Chez le tilapia du Mosambique *Oreochromis mossambicus* Peters (1852), une exposition à 1µg/l de DDT pendant 20 jours provoque, au niveau de l'ovaire, l'activation d'un phénomène de fibrogenèse, une diminution de la tunique ovarienne, une augmentation de l'espace interfolliculaire ainsi qu'une déformation de la structure des ovocytes matures ou en cours de maturation (Shukla et Pandey, 1985).

Une seconde expérience précédemment menée par Shukla et Pandey (1984) met en lumière chez *Colisa fasciatus* Bloch et Schneider (1801) exposé à 14mg/l d'arsenic pendant 15 à 30 jours, une inhibition du développement des ovocytes ainsi qu'une augmentation de l'atrésie préovulatoire.

Lorsque l'on expose les femelles de *Monopterus albus* à 3mg/l de cadmium pendant une période de 7 jours, celles-ci présentent une inhibition de l'ovogenèse, l'apparition de nécroses au niveau de l'ovaire ainsi qu'une désintégration de la structure de ce dernier (Singh, 1989).

L'exposition de la carpe commune au phénol à raison d'une concentration de 12mg/l et ce pendant 7 à 30 jours, induit une diminution de l'indice gonadosomatique IGS (Kumar et Mukherjee, 1988).

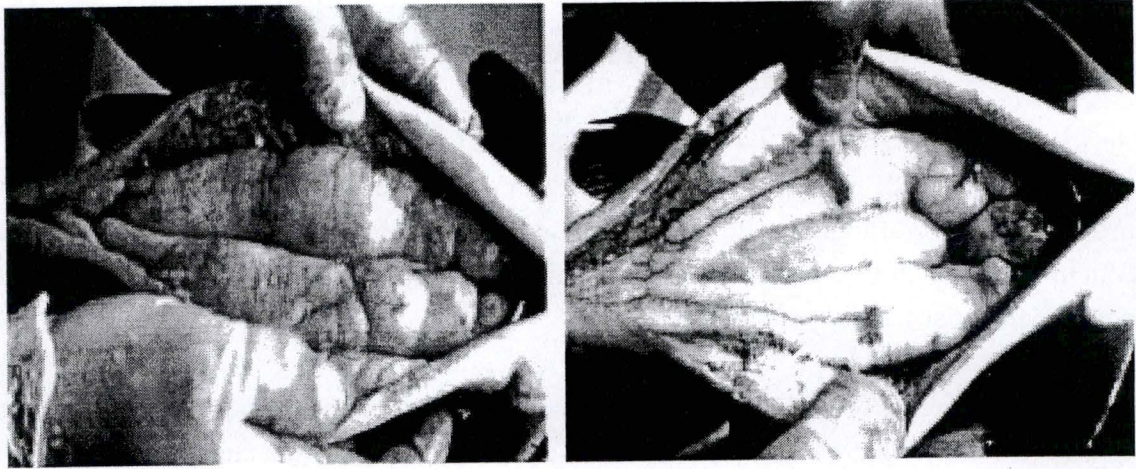
Un certain nombre de perturbations du système reproducteur femelle vient d'être brièvement illustré. Les phénomènes dominants sont :

- une incapacité des ovocytes à poursuivre un développement normal ;
- l'apparition de l'atrésie au niveau d'ovocytes préovulatoires ;
- une augmentation de l'espace interfolliculaire résultant d'une diminution de la taille des ovocytes.

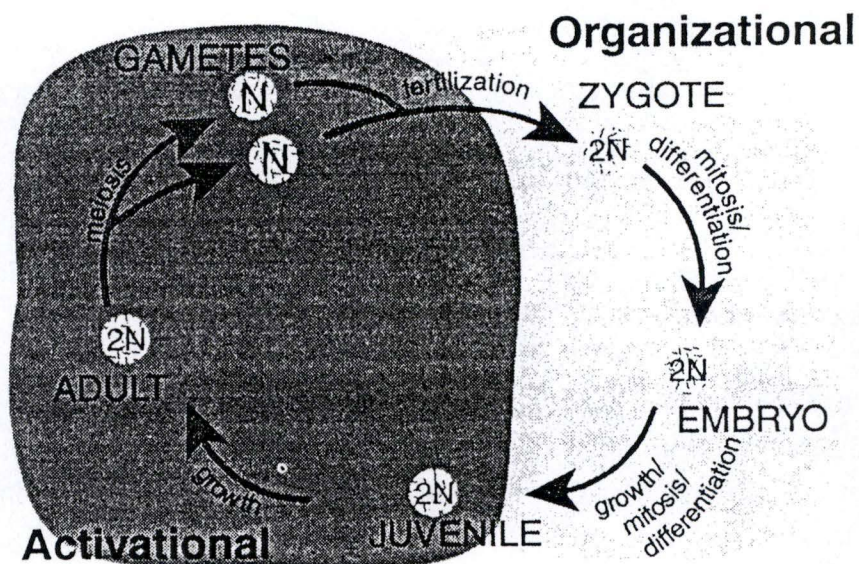
Toutes ensemble, ces altérations contribuent à la diminution de l'IGS qui est l'indice le plus souvent mesuré pour caractériser un dysfonctionnement engendré par un polluant (Kime, 1998). De plus, ces différents phénomènes seraient le résultat d'une diminution de la production de la vittelogénine par le foie, elle-même engendrée par une incapacité des follicules ovariens à produire le 17β-oestradiol (Kime, 1998).

D'autres effets morphologiques peuvent se manifester suite à une exposition aux EDCs. L'exemple le plus frappant est celui de la masculinisation d'individus femelles par une





**Figure 1.16.** Ovaires du suceur blanc (*Catastomus commersoni*) pendant la période normale de ponte. Le poisson de gauche provient d'une population vivant dans une zone non contaminée du lac supérieur (Canada). Le poisson de droite est issu d'une population vivant dans une zone contaminée par les BKMEs. La taille des ovaires est significativement réduite chez l'individu issu du site contaminé.



**Figure 1.9.** Cycle de vie d'un organisme diploïde se reproduisant de façon sexuée. Les différentes étapes peuvent voir leur équilibre perturbé d'une manière organisationnelle ou activationnelle par l'action d'un perturbateur endocrinien (Crain, 1997).



contamination aux effluents provenant d'usines de blanchiment de la pâte à papier (bleached kraft mill effluents : BKMEs).

Chez le gambusie *Gambusia affinis* Baird et Girard (1853), les femelles exposées en condition naturelle aux BKMEs montrent des signes de masculinisation se caractérisant principalement par la présence d'un gonopode (figure 1.15) qui est, chez les mâles adultes de la même espèce, l'organe copulateur servant à l'insémination des femelles (Bortone et Davis, 1994). En addition au développement du gonopode, on observe chez les individus exposés un comportement de mâle, l'existence d'ovocytes vittelogéniques associés à des cystes de spermatides et à des spermatozoïdes ainsi qu'un taux de mortalité élevé (Bortone et Davis, 1992).

Au Canada, dans la région des grands lacs, des populations du Meunier noir *Catostomus commersoni* Lacepède (1803) soumises aux BKMEs présentent une réduction de la taille des gonades (figure 1.16), un retard dans la maturité sexuelle ainsi qu'une réduction de l'expression des caractères sexuels secondaires (Van Der Kraak *et al.*, 1998).

A l'heure actuelle, on ne connaît pas avec certitude quels sont les composés chimiques responsables des effets délétères observés chez les poissons soumis aux BKMEs. Cependant, Howell et Denton (1989) suggèrent que les produits de dégradation de stérols d'origine végétale ( $\beta$ -sitosterol, campesterol et stigmastanol) seraient aptes à induire certains de ces effets. De plus, ces différents composés agiraient en se liant aux RE, RA et SHBGs (Hewitt *et al.*, 2000).

Un autre effet pouvant avoir des conséquences importantes sur la reproduction est la maturation avancée des femelles exposées aux xéno-œstrogènes. En effet, ces derniers induisent une maturation précoce des ovocytes en dehors de la saison de reproduction. Un exemple significatif à l'égard de cette problématique est celui impliquant le détroit de Puget sur la côte ouest des Etats-Unis, qui est largement contaminé aux PCBs, DDT/DDE et hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) (Collier *et al.*, 1998). Une série d'études portant sur différentes populations incluant le carlottin Anglais *Parophrys vetulus* Girard (1854) a mis en évidence une maturation précoce des ovocytes chez les femelles (Johnson *et al.*, 1997).

Une autre investigation menée par Janssen *et al* (1995) sur le flétan *Pleuronectes flesus* Linnaeus (1758) résidant dans la zone portuaire de Rotterdam a permis de mettre en évidence chez les femelles une maturation précoce des ovocytes corrélée avec un niveau en vittelogénine élevé (figure 1.17). Il semble que ce dysfonctionnement soit, lui aussi, l'effet d'une exposition aux PAHs et notamment au benzo[a]pyrene.



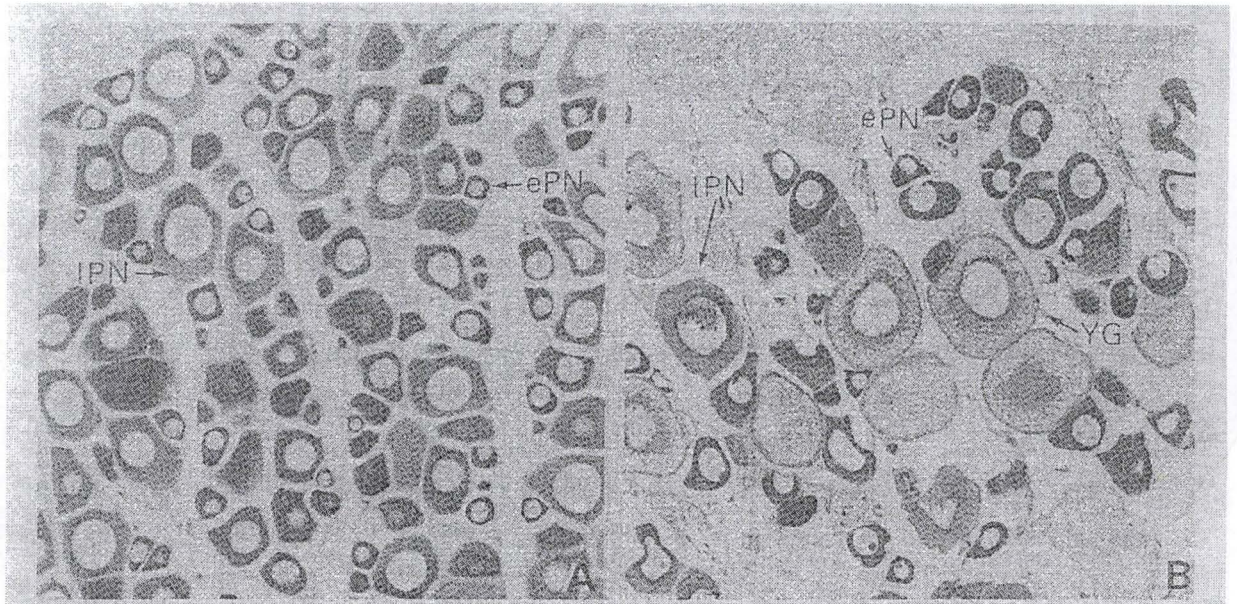


Figure 1.17. Développement ovarien chez la plie, *Pleuronectes flesus*, dans un mésocosme (HE, x90). A) ovaire en prévitellogénèse (stade périnucléolaire) dans le mésocosme contrôle ; les ovocytes primaires en croissance primaire se situent dans les lamelles ovariennes. B) ovaire dans le mésocosme pollué en vitellogénèse prématurée. Ovocytes au stade « yolk granule » (YG) sont présents comme les ovocytes dans la phase de croissance primaire (Janssen, 1995).



### B. Altération de la stéroïdogénèse ovarienne

Comme souligné précédemment, la diminution de la sécrétion en  $17\beta$ -oestradiol serait à l'origine de nombreuses perturbations du système reproducteur femelle. Il est cependant difficile de savoir si l'action délétère des EDCs se fait de façon directe en inhibant la stéroïdogénèse au niveau des follicules ovariens, ou s'ils agissent de façon indirecte via une diminution de la sécrétion des GtHs hypophysaires. Un certain nombre d'études ont cependant réussi à corréler effets morphologiques des EDCs et mécanismes d'action de ces derniers (tableau 1.10).

Les perturbations observées chez le tilapia du Mozambique lors de son intoxication au DDT sont dues à une action directe du toxique sur certaines enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse. En effet, le DDT agit en inhibant la  $3\beta$ -HSD et la  $17\beta$ -HSD (figure 1.13) qui sont deux enzymes intervenant dans la voie de synthèse des stéroïdes sexuels. Cette double inhibition a pour conséquence de diminuer la production des différents androgènes et oestrogènes (Shukla et Pandey, 1985).

Une autre enzyme pouvant être la cible des EDCs est la P450 aromatase qui catalyse la formation du  $17\beta$ -oestradiol à partir de la testostérone. Une étude menée par Monod *et al* (1993) montre que le fongicide imidazole agit en diminuant l'activité de l'aromatase chez la truite arc-en-ciel, et que cette inhibition est corrélée avec des niveaux en  $17\beta$ -oestradiol plus faibles.

Singh (1989), lors de son expérience sur *Monopterus albus* Zouiev (1793) exposé au cadmium, a pu démontrer une diminution de la sécrétion du  $17\beta$ -oestradiol corrélée avec un niveau en vittelogénine beaucoup plus faible. Cependant, l'auteur ne précise pas selon quel schéma le cadmium permet cette modulation.

Une seconde étude menée par Thomas (1989) a cependant supporté l'idée selon laquelle le cadmium agirait en modulant la sécrétion des GtHs hypophysaires.

En ce qui concerne l'action des BKMEs sur le meunier noir, il semblerait que celle-ci soit responsable d'une réduction des niveaux de  $17\beta$ -oestradiol et de testostérone pendant la croissance ovocytaire, ainsi que d'une diminution des niveaux en testostérone et  $17\alpha,20\beta$ -DHP pendant la maturation finale et la ponte (Mc Master *et al.*, 1991). Notons que des déplétions en 11-KT et  $17\alpha,20\beta$ -DHP sont aussi de mise pour les individus mâles exposés. Van Der Kraak *et al* (1992) précisent le mode d'action des BKMEs en mettant en évidence une diminution des niveaux plasmatiques en GtH2 chez les mâles et les femelles intoxiqués. Ces niveaux sont 30 à 50 fois plus faibles que ceux mesurés chez des individus contrôles provenant de sites de référence non pollués. De plus, l'action des BKMEs se marque principalement par une inhibition de la P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  et de la P-450<sub>17,20</sub>lyase (figure 1.13) qui



interviennent dans les étapes de formation des stéroïdes sexuels se trouvant en aval de la pregnenolone (Mc Master *et al.*, 1995).

Le mode d'action des PAHs semble complexe mais Janssen *et al* (1996) invoquent une diminution du catabolisme des stéroïdes au niveau du foie, ce qui serait à l'origine d'une plus grande concentration en  $17\beta$ -oestradiol biologiquement actif et, par voie de conséquence, à une augmentation de la synthèse en vittelogénine.

### *C. Autres effets des polluants sur le système reproducteur femelle*

Les effets des polluants sur le système reproducteur femelle ne se limitent pas à une action directe sur la morphologie des ovaires et le développement des ovocytes. D'autres niveaux de perturbation peuvent être mis en évidence pour caractériser l'action délétère d'un polluant.

#### **a) Altération de la maturation ovocytaire, de l'ovulation et de la ponte**

Il y a peu d'informations concernant l'impact des polluants sur la maturation ovocytaire, l'ovulation et la ponte. En effet, la maturation ovocytaire est de faible durée chez les cyprinidés (24 heures) et salmonidés (7 jours). Cette courte période rend la mise au point d'un protocole expérimental compliquée (Kime, 1998). Dans la majorité des cas, les retards de maturation, d'ovulation et de ponte sont dus à une perturbation de la vittelogenèse. Cependant, certaines études ont permis de mettre en évidence un effet direct des EDCs sur ces différentes étapes (tableau 1.11).

Haider et Inbaraj (1988) ont mis en avant, chez la carpe commune en phase de maturation ovocytaire, une réduction significative du nombre de GVBD lors d'une intoxication *in vitro* à  $50\mu\text{g/l}$  de malathion et endosulfan, et ce pendant une période de un jour et demi. Ceci suggérerait, à la vue de la faible dose en toxiques utilisée, que la phase de maturation ovocytaire est l'une des plus sensibles.

Chez le meunier noir, une exposition aux BKMEs empêche l'ovulation et ce, malgré une stimulation par injection de GnRH. Comme susmentionné, les BKMEs diminuent la synthèse de la  $17\alpha,20\beta$ -DHP. Cette déplétion hormonale induit un retard dans la phase de maturation et, par voie de conséquence, dans l'ovulation (Van Der Kraak *et al.*, 1992).

Tableau 1.11. Effets des EDCs sur la maturation ovocytaire, l'ovulation et la ponte

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Cuivre	<i>Pimephales promelas</i>	0,037	120	Perturbation de la ponte	Pickering <i>et al.</i> , 1977
2,4-D	<i>Lepomis macrochirus</i>	5	150	Retard de ponte	Cope <i>et al.</i> , 1970
Methoxychlor	<i>Jordenela floridae</i>	1,4	0,08	Retard de ponte	Holdway et Dixon, 1986
Fenitrothion	<i>Poecilia reticulata</i>	0,1 - 1,5	60	Avortement	Yasuno <i>et al.</i> , 1980
Malathion	<i>Mystus vittatus</i>	0,01 - 1	1 <i>in vitro</i>	Inhibition de la formation des GVBs par la GtH2	Haider et Upadhyaya, 1986
Birlane	<i>Mystus vittatus</i>	0,00001-0,001	1 <i>in vitro</i>	Inhibition de la formation des GVBs par la GtH2	Haider et Upadhyaya, 1986

Tableau 1.12. Effets des EDCs sur le nombre et la viabilité des œufs

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Cuivre	<i>Catostomus commersoni</i>	0,012 - 0,015	Durée de vie	Diminution de la taille des œufs déformité des larves	Munkittrick et Dixon, 1989
Chlordecone	<i>Cyprinodon variegatus</i>	0,00007-0,0001	141	Réduction de la production en œufs, faible taux d'éclosion	Goodman <i>et al.</i> , 1982
DDT	<i>Merlangus merlangus</i>	0,02	Durée de vie	Diminution de l'éclosion	Von Westerhagen <i>et al.</i> , 1989
Methoxychlor	<i>Jordenela floridae</i>	1,4	0,08	Réduction de la production en œufs, diminution de l'éclosion	Holdway et Dixon, 1986

Tableau 1.15. Effets des EDCs sur la morphologie et la motilité des spermatozoïdes

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Cadmium	<i>Clarias gariepinus</i>	100	1	Suppression de la motilité des spermatozoïdes	Kime <i>et al.</i> , 1996
Cadmium	<i>Clarias gariepinus</i>	0.001	6 heures	Les spermatozoïdes exposés présentent une diminution de la motilité	Rurangwana <i>et al.</i> , 1998



### b) Altération du nombre et de la viabilité des gamètes

Comme souligné précédemment, l'action des EDCs se marque notamment par une diminution de la production en vittelogénine au niveau des hépatocytes ou par une incapacité des ovocytes à internaliser cette vittelogénine.

Pour faire face à cette perturbation, les individus intoxiqués vont produire moins d'œufs de taille normale ou le même nombre d'œufs mais ceux-ci, de taille réduite (Tyler et Sumpter, 1996). De plus, un toxique peut agir en altérant la qualité des protéines constitutives du vitellus. Cette altération peut survenir lors de la synthèse au niveau du foie ou lors de la conversion de la vittelogénine à l'intérieur des ovocytes (Kime et Nash, 1999).

En règle générale, on évalue la viabilité des gamètes en déterminant le taux de fertilisation, le taux d'éclosion ou la survie des larves et ce, par rapport à des ovules et spermatozoïdes issus de parents intoxiqués (Kime et Nash, 1999). Le mécanisme responsable de la diminution de la viabilité des gamètes a été peu étudié, surtout en ce qui concerne les effets à long terme n'apparaissant qu'en seconde génération. Le tableau 1.12 reprend cependant une série de données relatives à l'action des EDCs sur le nombre et la viabilité des œufs pondus par des femelles intoxiquées.

### 2.3.3. Perturbation du système reproducteur mâle

Au même titre que les poissons du sexe femelle, les individus mâles peuvent voir leur système reproducteur altéré par la présence de polluants dans leur milieu de vie. Les effets de ces perturbateurs peuvent se caractériser par :

- une action cytotoxique sur les cellules testiculaires provoquant ainsi une altération de la morphologie des testicules ;
- une altération de la stéroïdogénèse testiculaire ;
- un retard dans le développement des cellules germinales ;
- une perturbation de l'expression des caractères sexuels secondaires et du comportement notamment, pendant la période de reproduction.

#### A. Altération de la morphologie testiculaire et de la spermatogenèse

Les effets des polluants sur la morphologie des testicules et la spermatogenèse sont divers (tableau 1.13). Les exemples qui suivent tentent d'illustrer au mieux cette problématique.

Le cadmium est l'un des métaux lourds causant le plus de dégâts au sein de la structure des testicules. Chez le saumon de fontaine *Salvelinus fontinalis* Mitchell (1814), une exposition à

**Tableau 1.13.** Effets des EDCs sur la morphologie des testicule et la spermatogenèse

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Chlordecone	<i>Heteropneustes fossilis</i>	0,024	60	Dégénérescence des testicules	Srivastva, 1994
Endosulfan	<i>Channa striata</i>	0,00075-0,001	2 - 30	Dommages aux testicules, inhibition de la spermatogenèse	Arora et Kulshrestha, 1984
Fenitrothion	<i>Channa punctatus</i>	1,5	120	Inhibition de la spermatogenèse, diminution du GSI, nécroses aux niveau des spermatides	Saxena et Mani, 1987
Carbofuran	<i>Channa punctatus</i>	5	120	Diminution du poids des testicules, retard dans la formation du sperme	Saxena et Mani, 1987

**Tableau 1.14.** Effets des EDCs sur la stéroïdogenèse testiculaire

Polluant	Espèce	Dose (mg/l)	Temps (jours)	Effet	Référence
Malathion	<i>Monopterus albus</i>	9	7	Réduction de la testostérone	Singh, 1993
Quinalphos	<i>Clarias batrachus</i>	0,025	15	Diminution de l'activité de la 3 $\beta$ -HSD et de la 17 $\beta$ -HSD	Bagchi <i>et al.</i> , 1990
4-Nonylphenol	<i>Ictalurus punctatus</i>	79 - 237 <i>in vitro</i>	1	Induction de vittelogénine chez les juvéniles	Nimrod et Benson, 1996



25µg/l de cadmium pendant 24 heures engendre, au niveau des testicules, une désintégration des cellules constitutives des lobules ainsi que des hémorragies et nécroses multiples. Aucun dommage n'est cependant mis en évidence au niveau des cellules germinales (Sangaland et O'Halloran, 1972). Une vacuolisation et destruction des spermatogonies et spermatocytes primaires ainsi que des dommages au niveau des spermiductes ont été mis en évidence chez *Puntius ticto* suite à son intoxication pendant 4 jours à 26mg/l de cadmium (Pundir et Saxena, 1990).

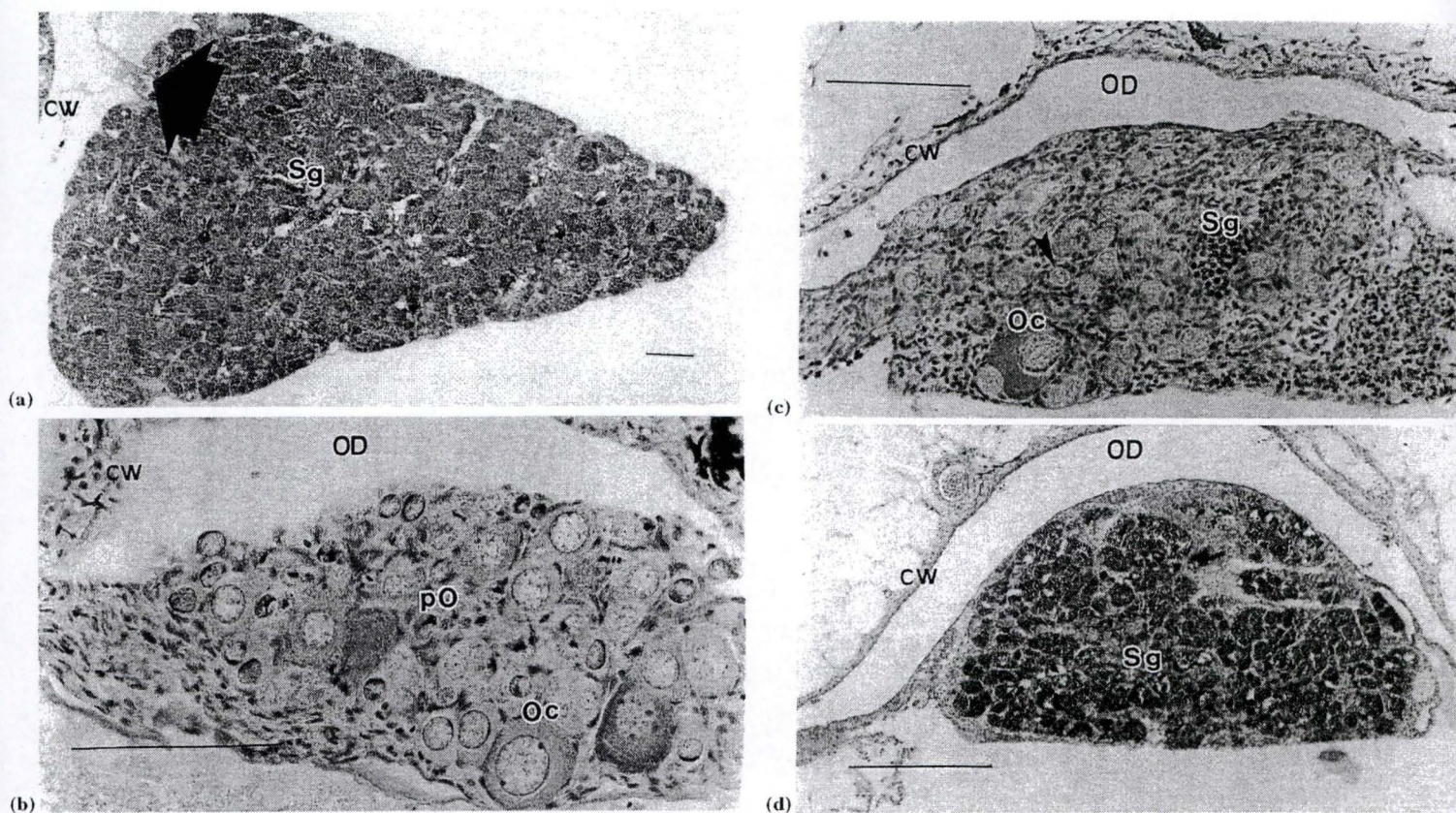
Les composés organochlorés présentent également une action significativement délétère sur l'intégrité des testicules. Ainsi, le DDT à une concentration de 1µg/l induit, chez le tilapia du Mozambique intoxiqué pendant 20 jours, une déformation des lobules séminifères, une dégénérescence des cellules germinales ainsi qu'une atrophie des spermatocytes primaires et secondaires (Bhattacharya et Pandey, 1989).

Les BKMEs interviennent également quant à l'altération du système reproducteur mâle. En effet, lorsque l'on expose le gardon *Rutilus rutilus* Linnaeus (1758) aux BKMEs, et ce pendant l'ensemble de son cycle de vie, on observe un retard dans le processus de maturation ainsi qu'une diminution du GSI. Cependant, l'intégrité des cellules germinales et des tissus gonadaux reste entière (Sandström *et al.*, 1988). Le même type d'effets est mis en évidence chez les mâles du meunier noir lorsque ceux-ci sont mis en contact avec les BKMEs (Mc Master *et al.*, 1992).

La perturbation histologique la plus spectaculaire au niveau des testicules est celle engendrée par les xéno-oestrogènes. Ces derniers sont en effet responsables de la mise en place aux stades juvénile et adulte d'un ovotestis (figure 1.18) chez les mâles exposés. Cet ovotestis se caractérise par la présence simultanée des tissus ovariens et testiculaires. Dans le cas le moins sévère, l'ovotestis se caractérise par la présence d'ovocytes occasionnels au sein d'un tissu testiculaire normal. Lorsque la sévérité se fait plus accrue, on peut retrouver une grande région de tissus ovariens matures insérée dans un tissu testiculaire anormal (Jobling *et al.*, 1998).

Dans le milieu naturel, les cas de contamination aux xéno-oestrogènes sont principalement liés aux effluents provenant des boues d'épuration (Sewage Treatment Works : STWs) et des égouts. En Angleterre, et ce pour l'ensemble du territoire, les populations mâles du gardon, du goujon *Gobio gobio* Linnaeus (1758) et de la truite arc-en-ciel exposées aux STWs présentent une proportion importante d'individus témoignant un ovotestis (Jobling *et al.*, 1998 ; Jobling *et al.*, 1996 ; Routledge *et al.*, 1998). Notons que d'autres perturbations sont liées à une exposition aux STWs à savoir, une diminution du GSI associée à un retard de la croissance testiculaire, une hyperplasie du foie et, pour finir, une féminisation ou absence du canal déférent (Jobling *et al.*, 1998). De plus, Batty et Lim (1999) signalent une diminution significative de la taille du gonopode chez le gambusie lorsque celui-ci est mis en contact avec les STWs.





**Figure 1.18.** Féminisation des testicules d'un mâle juvénile de la carpe commune (*Cyprinus carpio*) lors d'une contamination au 4-*t*-penthyphenol et ce, pendant la différenciation sexuelle. (a) Mâle présentant une structure testiculaire normale après la période de différenciation sexuelle, on peut observer la présence de lobules séminifères spermatogénique (Sg) ainsi que le mur de la cavité coelomique (cw). (b) Testicule complètement féminisé après une exposition de 90 jours au 17 $\beta$ -oestradiol et montrant une activité d'oogenèse. (pO) : ovocytes en phase protoplasmique, (Oc) : ovocytes en vittelogenèse endogène, (OD) : oviducte, (cw) : mur de la cavité coelomique. (c) Ovotestis chez un mâle exposé pendant 90 jours à 90 $\mu$ g/l de 4-*t*-penthyphenol. On remarque la présence simultanée d'ovocytes en vittelogenèse endogène (Oc) et d'un tissu testiculaire (Sg). (d) Féminisation d'un testicule chez un mâle après une exposition de 90 jours à 90 $\mu$ g/l de 4-*t*-penthyphenol. On peut remarquer la présence d'une activité de spermatogenèse (Sg), d'un oviducte (OD) et du mur de la cavité coelomique (cw). (Gimeno *et al.*, 1998b).



Les perturbations engendrées par une exposition aux STWs sont liées à l'action de composés oestrogéniques. Lorsque des truites arc-en-ciel juvéniles sont intoxiquées pendant 2 semaines aux STWs, leur bile accumule des oestrogènes naturels ( $17\beta$ -oestradiol, oestrone) ainsi que des oestrogènes de synthèse ( $17\alpha$ -éthinyloestradiol) (Larsson *et al.*, 1999). Harries *et al* (1997) avancent, quant à eux, que tous les effets induits par les STWs peuvent aussi être assimilés à l'action d'alkylphénols. En effet, Gimeno *et al* (1998) ont mis en évidence, chez le mâle adulte et les juvéniles de la carpe commune exposés au 4-*t*-pentylphénol, la présence d'ovotestis ainsi qu'une inhibition de la spermatogenèse et une diminution du GSI.

### *B. Altération de la stéroïdogénèse testiculaire*

Dans une grande majorité, les effets délétères observés aux niveaux de la morphologie des testicules et de la spermatogenèse sont intimement liés à une altération de la synthèse des stéroïdes testiculaires (tableau 1.14). Il est cependant difficile de savoir si l'action perturbatrice des polluants se marque de façon directe en inhibant la stéroïdogénèse au niveau des cellules interstitielles, ou de façon indirecte via une diminution de la sécrétion des GtHs hypophysaires. Un certain nombre d'études ont cependant réussi à corréler effets morphologiques engendrés par les EDCs et mécanismes d'action de ces derniers.

Le mode d'action du cadmium en tant que perturbateur endocrinien n'est pas encore bien ciblé. Une étude menée par Thomas (1989) a cependant supporté l'idée selon laquelle le cadmium agirait en modulant la sécrétion des GtHs hypophysaires. Aussi, on suppose que le cadmium inhiberait la formation de la testostérone et de la 11-Ketotestostérone à partir de la pregnenolone (figure 1.13). Les travaux de Freeman et Sangalang (1977) supportent cette hypothèse.

Après 20 jours d'exposition à 0,001 mg/l de DDT, on observe, au niveau des cellules interstitielles du tilapia du Mozambique, une absence de l'activité de la  $3\beta$ -HSD (figure 1.13 et 1.7) et de la  $17\beta$ -HSD (Bhattacharya et Pandey, 1989).

Les BKMEs agissent selon le même schéma chez les mâles et femelles intoxiqués. Nous invitons le lecteur à retourner au point 1.2.3.2.2 pour un rappel du mécanisme.

Les effets délétères induits par une contamination aux STWs sont, sans aucun doute, provoqués par l'action de xéno-oestrogènes. Des recherches menées par Purdom *et al* (1994) ont montré, chez la truite arc-en-ciel mâle exposée aux STWs, un taux plasmatique en vittologénine très élevé (147mg/ml) correspondant à celui pouvant être mesuré chez les femelles en cours de vittologénèse exogène.



Les alkylphenols sont, eux aussi, aptes à induire une synthèse de vittelogénine chez les mâles. Lorsque l'on intoxique des populations masculines de la truite arc-en-ciel avec des concentrations en nonylphenol (NP) présentent dans l'environnement ( $\leq 20\mu\text{g/l}$ ), celles-ci présentent des taux élevés en vittelogénine (Jobling *et al.*, 1996).

Les STWs et alkylphenol agissent donc en induisant la synthèse de vittelogénine au niveau du foie et ce, en se liant aux récepteurs à l'œstrogène.

### *C. Altération du comportement de reproduction*

Les comportements reproducteurs et notamment celui de cour, sont régulés par des facteurs hormonaux et neuraux. Ces préliminaires jouent un rôle important dans le mécanisme de reproduction car ils permettent la mise en place d'une coordination entre mâles et femelles et ce principalement lors de la période de ponte (Kime, 1998). Au-delà d'une reconnaissance visuelle, les poissons utilisent des signaux olfactifs que sont les phéromones. Les principales phéromones utilisées comme signaux moléculaires dans le cadre de la reproduction sont des stéroïdes sexuels, des métabolites de ces derniers ou des prostaglandines. En général, la femelle en fin de vittelogenèse exogène libère une petite quantité de phéromones. Pour détecter la présence du signal dans le milieu, le mâle doit posséder des récepteurs olfactifs spécifiques et doit être capable d'interpréter le signal en élevant son propre taux hormonal.

Des études récentes ont montré que des polluants pouvaient affecter cet aspect du mécanisme reproducteur.

Une exposition pendant une durée de 5 jours à  $1\mu\text{g/l}$  de diazinon réduit le taux plasmatique en  $17\alpha,20\beta\text{-HSD}$ , testostérone et  $\text{GtH2}$  chez le mâle du saumon atlantique *Salmo salar* Linnaeus (1758) lorsque celui-ci est mis en présence d'urine provenant de femelles de la même espèce ayant ovulé (Moore et Waring, 1996).

Le carbofuron à une concentration de  $0,001\text{ mg/l}$  interfère avec le système de reconnaissance olfactive permettant aux mâles du saumon atlantique de répondre à la présence de la prostaglandine  $\text{F2}\alpha$  sécrétée par des femelles de la même espèce ayant ovulé. Lorsque la dose est égale à  $0,003\text{mg/l}$ , on observe une diminution significative des taux de testostérone,  $11\text{-Ketotestostérone}$  et  $17\alpha,20\beta\text{-DHP}$  (Waring et Moore, 1997).

### *D. Autres effets des polluants sur le système reproducteur mâle*

Les effets des polluants sur le système reproducteur mâle ne se limitent pas à une action directe sur la morphologie des testicules, la spermatogenèse et la biosynthèse des stéroïdes testiculaires. D'autres niveaux de perturbation peuvent être mis en évidence pour caractériser l'action délétère d'un polluant. L'altération de la motilité et de la morphologie des spermatozoïdes constitue un de ces niveaux de perturbation.



L'action d'un toxique sur la morphologie et la motilité des spermatozoïdes peut se dérouler selon différents procédés :

- par une altération de la balance hormonale interne lors de la spermatogenèse ;
- par une altération de la fonction des cellules de Sertoli ;
- par une diminution de la synthèse de la  $17\alpha,20\beta$ -DHP, ce qui interfère avec le processus de maturation ;
- par des effets délétères sur les spermatozoïdes eux-mêmes.

Le tableau 1.15 illustre brièvement cette problématique mais uniquement pour ce qui concerne le cadmium.

### 3. Effets des polluants sur le système immunitaire : L'immunotoxicologie chez le poisson

#### 3.1. Introduction

Chez les poissons, on a longtemps suspecté qu'il existait un lien entre les contaminants environnementaux et la recrudescence de maladies. Une des explications serait qu'il existe une modulation des mécanismes de défense immunitaire spécifiques et non-spécifiques par des toxiques et autres polluants présents dans l'environnement. Au-delà d'une approche fondamentale de cette problématique, la compréhension des mécanismes immunotoxicologiques liés aux contaminants aquatiques pourrait servir à anticiper un éventuel effet délétère sur la santé humaine (Bols *et al.*, 2001).

L'immunotoxicologie aquatique est devenue un terrain majeur d'investigations depuis une dizaine d'années. Ce regain de motivation est principalement lié à des intérêts économiques inhérents au développement croissant de l'aquaculture dans le monde industrialisé. Cependant, les études immunotoxicologiques menées focalisent sur un aspect quantitatif de la problématique, c'est-à-dire sur des niveaux d'organisation touchant la dynamique de la population. Beaucoup moins de recherches ont été réalisées quant aux effets immunotoxicologiques sur des niveaux d'organisation inférieures (Wester *et al.*, 1994).

#### 3.2. Le système immunitaire chez le poisson

Bien que les espèces de poissons téléostéens les plus phylogénétiquement avancées ne possèdent pas de moelle osseuse ni de nodules lymphoïdes, elles présentent des tissus hématopoïétiques fonctionnels principalement associés aux reins, thymus et à la rate. Les poissons contiennent des globules blancs circulants qui sont morphologiquement et



fonctionnellement similaires aux lymphocytes, granulocytes et monocytes des mammifères (Enane *et al.*, 1993). En outre, les poissons sont capables de synthétiser des anticorps spécifiques suite à une stimulation antigénique, de produire des lymphokines, d'éliminer par phagocytose des pathogènes et de produire une réponse médiée par les lymphocytes. (Zelikoff, 1991).

Les cellules impliquées dans les différents mécanismes immunitaires sont, chez le poisson :

- des cellules analogues aux lymphocytes-B et aptes à produire des anticorps ;
- des lymphocytes-T participant aux mécanismes immunitaires médiés par les cellules et aptes à répondre aux composés mitogènes ;
- des cellules cytotoxiques non-spécifiques (Nonspecific Cytotoxic Cell : NCC) qui sont équivalentes aux cellules tueuses (Natural Killer Cell :NKC)des mammifères ;
- des cellules phagocytaires incluant les macrophages et les leukocytes polymorphonucléaires neutrophiles (PMN).

La partie non-spécifique du système immunitaire du poisson est principalement associée aux macrophages, PMN et NCC. Ces différentes cellules sont assistées dans leur action par une variété de facteurs solubles se trouvant dans le sérum sanguin et qui incluent le lysozyme, les interférons, les transferrines ainsi que les protéines C-réactives (Zelikoff, 1998). Notons que les macrophages sont d'une importance capitale pendant le développement embryonnaire car ils remplissent à eux seuls une variété importante de fonctions et ce, en jouant le rôle d'effecteur, de médiateur et de suppresseur au sein des défenses immunitaires précoces (Zeeman et Brindley, 1981).

Les mécanismes de défense immunitaire spécifiques du poisson sont les mêmes que ceux des mammifères et comprennent des réponses médiées par des cellules et par des facteurs humoraux.

Les cellules à l'origine de la synthèse des anticorps sont analogues aux lymphocytes-B des mammifères. Cependant, alors que cinq classes d'immunoglobulines (Ig) sont répertoriées chez les mammifères, les anticorps produits par les poissons semblent être restreints à une seule catégorie ressemblant aux IgM des mammifères (Zelikoff, 1998).

### *3.3. Effets des polluants sur l'immunité non-spécifique*

#### **3.3.1. Introduction**

L'intégrité des mécanismes de défense immunitaire non-spécifiques est d'une importance capitale pour la survie des poissons dans le milieu aquatique. En effet, les mécanismes non-spécifiques sont les premiers à réagir lorsqu'un individu est confronté à un pathogène. De plus, ils sont les seuls à pouvoir entrer en action lors du développement embryonnaire.



Un nombre très important d'études ont été menées pour caractériser l'action de polluants sur l'immunité non-spécifique. Cependant, la méthodologie utilisée est peu standardisée et il est donc difficile de mettre en parallèle ou d'opposer des résultats provenant d'études différentes. Une difficulté supplémentaire s'ajoute en ce sens où des investigations menées *in vivo* et *in vitro* ne sont que très rarement corrélées.

### 3.3.2. L'immunité non-spécifique externe

La première barrière qui est rencontrée par les microbes (bactéries, virus et protozoaires) est, chez le poisson, la couche muqueuse des branchies, de la peau, du système digestif et du tractus uro-génital. Cette surface constitue un obstacle physique mais peut aussi contenir des agents anti-microbiens. Ceux-ci incluent le lysozyme, le complément et bon nombre d'enzymes protéolytiques (Shephard, 1994). De plus, la muqueuse serait associée à la présence d'immunoglobulines (Ig) présentant une structure et une fonction différente de leurs analogues sanguins rappelant en cela les IgA des mammifères (Rombout, 1993).

Les différentes recherches menées quant à l'action de polluants environnementaux sur l'intégrité de la muqueuse et ses constituants ont largement été focalisées sur les branchies et la peau. En effet, les branchies sont d'une importance particulière car elles constituent un site d'entrée pour les pathogènes et ce, en raison de la faible épaisseur de l'épithélium branchial (Evelyn, 1996).

#### A. La muqueuse branchiale

La problématique de l'impact de toxiques environnementaux sur l'intégrité des branchies et de la muqueuse branchiale peut être envisagée selon deux approches différentes.

Dans un premier temps, on peut mettre en évidence une action délétère des polluants sur les cellules épithéliales branchiales. Les lésions le plus souvent observées sont de types nécrotique, hyperplasique et hypertrophique. Dans une très grande majorité, ces lésions sont le fruit d'une exposition à de fortes concentrations en métaux lourds et autres PAHs (Mallatt, 1985). L'impact de ces dommages structurels sur la fonction de barrière anti-bactérienne des branchies est difficile à mesurer. Cependant, une entrée plus rapide d'agents bactériens dans le système sanguin peut être envisagée comme effet principal d'une lésion de l'épithélium branchial (Browers, 1981).

Dans un second temps, on peut caractériser une action directe des toxiques sur la muqueuse. Lorsque la carpe commune est exposée à des concentrations élevées en cadmium, on remarque une diminution du nombre de cellules à mucus corrélée avec une chute de la sécrétion de mucus (Sovenyi et Szakolczai, 1993). D'autres études mettent en évidence un

effet inverse notamment chez *Lepomis macrochirus* Rafinesque (1819) lorsque celui-ci est contaminé au malathion (Richmond et Dutta, 1989).

Un autre effet caractéristique d'une exposition à un toxique est la création d'un influx de cellules leucocytaires vers les branchies qui serait à l'origine d'une augmentation des défenses immunitaires non-spécifiques au niveau de la muqueuse branchiale (Mallatt, 1985).

### *B. La muqueuse cutanée*

La problématique de l'altération de la muqueuse cutanée par les toxiques environnementaux est complexe, surtout en ce qui concerne l'impact des métaux lourds. Le cadmium semble une nouvelle fois être d'une importance capitale. En effet, on observe chez la carpe commune exposée au cadmium une augmentation de la sécrétion de mucus ainsi qu'une variation de la composition de ce dernier (Iger *et al.*, 1994). Etant donné que certains microorganismes (souche vibrio) possèdent une capacité d'utilisation du mucus comme source de carbone, on considère qu'une hypersécrétion peut les amener à être soumis à une exposition bactérienne plus importante (Bordas *et al.*, 1996).

Au-delà de son action stimulatrice sur la sécrétion du mucus, le cadmium est aussi responsable d'une importante infiltration de leucocytes au niveau de l'épiderme. Cette migration des cellules leucocytaires serait à l'origine d'une leucopénie chez les individus intoxiqués (Iger *et al.*, 1994).

### 3.3.3. L'immunité non-spécifique interne

Comme illustré précédemment, les poissons possèdent un réseau complexe de mécanismes leur permettant de combattre les organismes pathogènes ayant réussi à franchir la barrière externe constituée par le mucus.

Les facteurs humoraux et cellulaires du système immunitaire non-spécifique interne seront tour à tour abordés quant à leur altération par différents toxiques environnementaux.

#### *A. Les facteurs humoraux*

Les facteurs humoraux (mécanismes de défense non-spécifiques et non-cellulaires) sont principalement composés de protéines et glycoprotéines. Dans le cadre d'études écotoxicologiques, les facteurs humoraux ont été largement étudiés, mais leur examen s'est limité à trois grands paramètres : le lysozyme, les protéines C-réactives et les interférons. Notons qu'il est difficile de dégager une information générale vis-à-vis de cette problématique



étant donné qu'il existe, comme chez les perturbateurs endocriniens, une spécificité de la réponse liée à l'espèce et au toxique étudiés.

#### a) Le lysozyme

Le lysozyme est une enzyme qui possède la capacité d'altérer la paroi des bactéries et ce, en exerçant une activité lytique vis-à-vis des protéoglycanes pariétaux. Le lysozyme agit directement sur la paroi des bactéries Gram<sup>+</sup>, mais son action sur la paroi des bactéries Gram<sup>-</sup> est indirecte car elle nécessite une altération préalable de la membrane externe par d'autres facteurs (Yano, 1996). Dans le cadre d'études écotoxicologiques, les concentrations en lysozyme ont été mesurées à partir du plasma ou du sérum sanguin.

Lorsqu'on expose des truites arc-en-ciel pendant 30 jours à de fortes doses en cadmium, mercure, zinc ou complexe des trois, on observe une augmentation de l'activité du lysozyme au sein du sérum sanguin (Sanchez-Dardon *et al.*, 1999).

Le cuivre possède quant à lui des effets délétères sur l'activité du lysozyme chez le barbeau argenté *Puntius gonionotus* Bleeker (1850). En effet, lorsque des barbeaux argentés sont soumis pendant 66 jours à des concentrations de 0,05 mg/l, 0,10 mg/l et 0,15 mg/l de cuivre, on peut remarquer une diminution significative de l'activité du lysozyme plasmatique et ce, pour chacune des concentrations en cuivre testées. De plus, lorsque les individus intoxiqués sont challengés avec la bactérie *Aeromonas hydrophilia*, on remarque une diminution progressive de la capacité de synthèse du lysozyme qui va croissant avec la dose en toxique testée (Shrariff *et al.*, 2001).

Il semblerait que les hydrocarbures, et notamment les formes brutes issues des puits de pétrole, possèdent un effet délétère sur l'activité du lysozyme des poissons. Lorsque des limandes *Limanda limanda* Linnaeus (1758) sont mises en contact avec ce type de contaminants, elles présentent des taux plasmatiques en lysozyme réduits et l'activité de l'enzyme semble fortement affectée (Tahir, 1993).

#### b) Les protéines C-réactives

Les protéines C-réactives (CRPs) interviennent principalement dans la réponse de phase aiguë. Lorsqu'un tissu est le siège de dommages et autres infections, la concentration plasmatique en CRPs peut augmenter rapidement de 25%. Les protéines C-réactives interviennent principalement dans la régulation de la phagocytose et dans l'activation de la voie classique du complément (Mortensen, 2000).

Les toxiques environnementaux sont connus pour induire une augmentation des concentrations plasmatiques en CRPs chez les poissons. En effet, lorsqu'on expose des truites

arc-en-ciel à des doses subléthales en Arochlor 1254 ou 3-méthylcholanthrene (3MC), les concentrations plasmatiques en CRPs sont 10 à 20 fois plus élevées et ce, 12 à 72 heures après le début de la contamination (Winkelhake *et al.*, 1983). Chez la carpe commune exposée à des doses subléthales en mercure, cadmium, phénol ou hexachlorocyclohexane, les concentrations plasmatiques en CRPs augmentent d'un facteur 3 à 4 après une période de 12 à 72 heures de contamination. Au delà d'une modulation quantitative, il semblerait qu'une altération qualitative des CRPs soit aussi de mise, notamment en ce qui concerne les mécanismes de glycosylation (Paul *et al.*, 1998).

La variation des concentrations en CRPs plasmatiques lors de contamination par des toxiques reste temporaire et ce, au même titre que la réponse de phase aiguë. De ce fait, l'utilisation des CRPs comme bioindicateur immunotoxicologique est peu fiable (Bols *et al.*, 2001).

### c) Les interférons

Les interférons jouent un rôle clef dans les mécanismes de défense antiviraux. Après avoir été activés par la présence de virus, les interférons agissent sur les cellules qui les entourent en activant la synthèse intracellulaire de protéines ayant la capacité d'inhiber la réplication virale.

Il existe peu d'information sur la modulation des interférons par les contaminants environnementaux et ce, malgré de nombreuses études inhérentes à l'action des virus chez le poisson.

Une étude *in vitro* menée sur des cellules du carassin doré *Carassius auratus auratus* Linnaeus (1758) prétraitées au carbaryl puis infectées par le virus du carassin doré-2 (GFV-2) met en évidence une diminution de la synthèse des interférons. Cette inhibition pourrait être à l'origine d'une augmentation de la réplication du GFV-2 dans les cellules intoxiquées (Shea et Berry, 1984). Le mécanisme à la base de la diminution de la synthèse des interférons ne serait cependant pas spécifique mais tout simplement lié à une suppression générale du métabolisme cellulaire.

## B. Les facteurs cellulaires

Les facteurs cellulaires (mécanismes de défense non-spécifiques et cellulaires) regroupent principalement des leukocytes phagocytaires et NCCs.

### a) Les leukocytes phagocytaires

Bien que les leukocytes phagocytaires possèdent différents modes d'action, celui le plus souvent étudié en écotoxicologie reste le mécanisme de phagocytose. Deux étapes de ce



processus semblent attirer davantage l'attention, à savoir le mécanisme d'internalisation des pathogènes ou phagocytose ainsi que l'explosion respiratoire ou explosion oxydative.

- ❑ **Les effets de métaux lourds sur la capacité d'ingestion de particules** par les phagocytes ont souvent été étudiés.

A faibles concentrations, le cadmium augmente l'activité phagocytaire des macrophages issus de la cavité péritonéale de truites arc-en-ciel intoxiquées. Cette stimulation fait cependant place à une inhibition si les doses utilisées deviennent trop importantes (Zelikoff, 1995).

De son côté, le chrome possède une action inhibitrice. Lorsqu'on expose le poisson chat *Saccobranchus fossilis* Bloch (1794) pendant 28 jours au chrome, les macrophages de la rate et des reins présentent une diminution de leur capacité à ingérer des particules exogènes (Khangarot *et al.*, 1999). D'autres métaux comme le nickel semblent ne présenter aucun effet sur la phagocytose.

Les PAHs, en particulier le benzo[a]pyrene, sont compétents en termes de modulation de la phagocytose. En effet, une injection de benzo[a]pyrene chez la truite arc-en-ciel réduit de manière significative, et ce un an après l'injection, la capacité d'internalisation de levures par les macrophages (Walczak *et al.*, 1987).

Enfin, les BKMEs ont été investigués comme potentiellement immunotoxiques pour les macrophages. Chez *Fundulus heteroclitus heteroclitus* Linnaeus (1766) provenant de sites contaminés par les BKMEs, on peut mettre en évidence une diminution significative de la compétence de phagocytose chez les macrophages et ce, en comparaison avec des cellules issues d'individus non contaminés (Fournier *et al.*, 1998).

- ❑ **L'explosion respiratoire des cellules phagocytaires "professionnelles"** (monocyte, PMN et macrophages) implique la réduction d' $O_2$  en radicaux superoxydes  $O_2^-$ . Ce processus est catalysé par la NADPH oxydase qui est localisée dans la membrane du phagosome. Les radicaux superoxydes peuvent être convertis par voie spontanée ou enzymatique en une série d'agents antibactériens dont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'acide hypochloreux (HOCl) et les radicaux hydroxyles ( $^{\circ}OH$ ) font partie.

Il existe une grande difficulté d'interprétation des données relatives à l'action immunosuppressive de polluants environnementaux sur les mécanismes antibactériens dépendant de l'oxygène. En effet, plusieurs techniques permettent de quantifier les différents produits formés au sein du phagosome mais chacune ne permet pas la même quantification. Une seule méthode beaucoup plus standardisée permettrait de mieux comparer les résultats provenant d'expérimentations différentes. Malgré cette difficulté, nous allons tenter d'illustrer au mieux cette problématique.



De longues périodes d'exposition *in vivo* au tributylthin (TBT) provoque chez le poisson chat américain *Ictalurus punctatus* une diminution significative de l'activité antibactérienne des leukocytes issus de la région péritonéale (Rice *et al.*, 1995). L'action du TBT sur l'activité des macrophages serait liée à une augmentation des concentrations intracellulaire en calcium.

Les métaux lourds jouent un rôle important dans l'altération de l'activité antibactérienne des macrophages mais, les différentes études menées sur le sujet sont contradictoires.

Chez la truite arc-en-ciel, une exposition au mercure inhibe l'activité des macrophages. Cet effet se marque d'autant plus si l'intoxication au mercure est renforcée par exposition au cadmium (Sanchez-Dardon, 1999).

En ce qui concerne l'action du cuivre, les avis sont moins tranchés. Chez la truite arc-en-ciel, le cuivre agirait en diminuant l'activité antibactérienne des leukocytes (Elsasser *et al.*, 1986) alors qu'une action stimulante sur l'activité des macrophages serait relevée chez le carassin doré (Muhvich *et al.*, 1995). Une troisième étude menée par Shariff (2001) sur le barbeau argenté a montré qu'une exposition à des concentrations de 0,05 mg/l, 0,10 mg/l et 0,15 mg/l de cuivre provoquait une augmentation de l'activité des macrophages mais que celle-ci diminuait fortement lorsque les poissons étaient contaminés avec la bactérie *Aeromonas hydrophilia*.

Il existe également des études conflictuelles en ce qui concerne l'action du cadmium sur les leukocytes phagocytaires. L'exposition du bar européen *Dicentrarchus labrax* Linnaeus (1758) pendant 15 jours à 40 ng/l de cadmium met en évidence une augmentation de l'explosion oxydative chez les macrophages associés au tissu rénal (Lemaire-Gony, 1995). De façon contraire, l'activité des macrophages péritonéaux de la truite arc-en-ciel est inhibée lors d'une intoxication au cadmium (Zelikoff, 1995).

Les BKMEs ont aussi été investigués en tant que perturbateur potentiel de l'activité des leukocytes phagocytaires. Chez *Fundulus heteroclitus*, une diminution de l'explosion s'observe chez les phagocytes provenant d'individus de sexe femelle intoxiqués aux BKMEs mais, cette inhibition n'est pas de mise chez les individus de sexe mâle (Fournier *et al.*, 1998). Dans ce cas de figure, les auteurs ont suggéré que la différence entre les deux sexes étaient probablement liée à des niveaux hormonaux différents. Une deuxième expérience menée par Aaltonen *et al* (2000) sur le gardon a permis de caractériser qu'une succession de deux intoxications aux BKMEs ne faisait pas varier l'activité des phagocytes que ce soit chez les femelles ou les mâles.



### b) Les Non-specific cytotoxic cells (NCCs)

Les NCCs médient les réponses cytotoxiques du système immunitaire non-spécifique et pourraient être les précurseurs phylogéniques des CNKs des mammifères. Elles interviennent en grande partie dans la résistance face aux infections virales et parasitaires mais surtout, elles permettent la lyse de certaines cellules tumorales (Evans et Jaso-Friedman, 1992).

Plusieurs classes de toxiques environnementaux ont été étudiées quant à leur action potentielle sur les NCCs.

Les PCBs et les pesticides furent les premiers à être étudiés mais il semblerait qu'ils ne soient pas aptes à induire une quelconque modulation de l'activité des NCCs.

Lorsque des truites arc-en-ciel sont exposées pendant 12 mois à des concentrations très variées en Aroclor 1254 et/ou mirex, aucune inhibition significative de l'activité des NCCs ne peut être mise en avant (Cleland et Sonstegard, 1987). De plus, les PCBs seraient également incompetents en matière de suppression de l'activité des NCCs.

Les PAHs, quant à eux, semblent diminuer l'activité des cellules intervenant dans le processus non-spécifique de cytotoxicité. L'exemple le plus marquant est sans doute celui caractérisant l'intoxication de *Opsanus tau* Linnaeus (1766) au 7,12-dimethylben[a]anthracene (DMBA). Chez les individus contaminés, une inhibition complète de l'activité des NCCs se fait sentir et ce même pour les doses en DMBA les plus faibles (Seeley et Weeks-Perkins, 1997).

D'autres mesures de l'action des PAHs sur les NCCs ont été effectuées *in situ*. Aux Etats-Unis, dans l'état de Virginie, des individus de l'espèce *Fundulus heteroclitus* prélevés dans des sites fortement contaminés par différents PAHs montrent dépression importante de l'activité des NCCs (Faisal *et al.*, 1991).

### 3.4. Effets des polluants sur l'immunité spécifique

L'étude de la modulation du système immunitaire spécifique par des polluants reste, tout comme son homologue non-spécifique, fortement quantitative. Plusieurs paramètres sont généralement utilisés en vue de caractériser une modulation de la réponse immunitaire spécifique chez des individus intoxiqués à savoir :

- un comptage des cellules lymphocytaires, voire un calcul du taux hématocrite ;
- une mesure de la concentration en immunoglobulines totales ;
- une stimulation *in vitro* de lymphocyte-T en présence de composés mitogènes.

Malgré un grand nombre d'études portant sur l'immunotoxicité chez le poisson, peu d'informations concernent la modulation de l'immunité spécifique. Nous sommes cependant dans la capacité d'illustrer la problématique par quelques exemples.

Lorsque des gardons sont soumis à deux reprises aux BKMEs, ils présentent une diminution significative du nombre de cellules aptes à produire des Igs dirigés contre un antigène spécifique et ce, aussi bien dans la rate que dans le sang (Aaltonen *et al.*, 2000).

Chez le barbeau argenté, une intoxication pendant 66 jours à des concentrations de 0,05 mg/l, 0,10 mg/l et 0,15 mg/l de cuivre provoque une diminution significative de l'hématocrite ainsi qu'une diminution de la concentration en Igs totales. Ces différences s'accroissent encore lorsque les individus sont contaminés avec une bactérie pathogène (Shariff *et al.*, 2001).

### 3.5. *La modulation du système immunitaire par les hormones*

#### 3.5.1. Introduction

Depuis plusieurs années, il est devenu évident que le système immunitaire et le système neuroendocrinien des mammifères sont intimement liés et qu'une communication bidirectionnelle entre ces deux systèmes est essentielle pour le maintien de l'homéostasie. Plus récemment, les interactions entre le système endocrinien et le système immunitaire chez les vertébrés non-mammaliens, et chez le poisson en particulier, ont reçu une attention accrue (Harris et Bird, 2000).

Les hormones sexuelles ont la possibilité de moduler le système immunitaire chez les mammifères, mais peu d'informations concernent les effets des hormones sexuelles sur la réponse immunitaire du poisson (Berczi et Nagy, 1998). Notons que les stéroïdes sexuels ne sont pas les seuls à intervenir en tant que modulateurs du système immunitaire. En effet, d'autres hormones comme le cortisol et la prolactine sont connues pour leurs actions immuno-modulatrices.

#### 3.5.2. Modulation par les stéroïdes sexuels

##### A. *L'oestradiol*

Chez les mammifères, l'oestradiol augmente l'activité des macrophages mais inhibe la production des CNKs. Le stéroïde stimulerait également la production d'anticorps et la synthèse de l'interleukine 1 (IL-1) (Harris et Bird, 2000).

Chez le poisson, l'oestradiol interviendrait comme modulateur et ce, selon différents mécanismes. Cook (1994) rapporte que l'oestradiol stimulerait la mitogenèse des cellules lymphocytaires chez la truite arc-en-ciel. Chez la carpe commune, l'oestradiol diminue significativement l'activité phagocytaire des leukocytes mais n'altère pas la formation des



radicaux superoxydes (Yamaguchi *et al.*, 2001). Une troisième étude menée par Wang et Belosevic (1994) sur le carassin doré a également mis en évidence une diminution de l'activité des macrophages.

### B. La testostérone

La testostérone est connue chez les mammifères pour son action inhibitrice sur la réponse immunitaire spécifique médiée par les immunoglobulines et sur la mitogenèse lymphocytaire.

Ce même type d'interférence serait de mise chez les poissons. En effet, Slater et Schreck (1993) suggèrent que la testostérone supprime la formation des anticorps par les lymphocytes-B chez le saumon royal *Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum (1792). Cette action de la testostérone serait renforcée par celle du cortisol. Les deux hormones seraient indépendantes et agiraient sur des cellules différentes mais leurs actions seraient synergiques. De plus, des études menées *in vitro* ont démontré que la testostérone pouvait tuer des leukocytes de salmonidés (Slater et Cook, 1993).

Plus récemment, la caractérisation de récepteurs aux stéroïdes sexuels a été découverte chez les leukocytes de salmonidés. Cette nouvelle information apporte une preuve supplémentaire quant au rôle immunorégulateur des stéroïdes sexuels chez le poisson (Patino et Maule, 1997).

### C. La 11-Kétotestostérone

Il existe peu d'information sur le rôle de la 11-Kétotestostérone en tant que modulateur du système immunitaire. Cependant, quelques études se sont penchées sur le sujet.

Chez la truite arc-en-ciel, la 11-Kétotestostérone inhiberait la mitogenèse lymphocytaire (Cook, 1994). Yamaguchi *et al* (2001) ont quant à eux mis en évidence une diminution significative de la phagocytose chez les juvéniles de la carpe commune lorsque ceux-ci sont mis en contact avec de la 11-Ketotestostérone. Aucune interférence n'est pourtant signalée en ce qui concerne la production des radicaux superoxydes.

## 3.5.3. Modulation par le cortisol

Le principal corticostéroïde produit par la glande surrénale des poissons téléostéens est le cortisol (Kime, 1987). Ce glucocorticoïde est généralement sécrété de façon plus abondante quand les poissons sont soumis à des conditions de stress, et il est bien connu pour son action immunosuppressive sur le système immunitaire.

Le cortisol possède un effet dépressif sur plusieurs mécanismes de défense immunitaire incluant la phagocytose et la mitogenèse des lymphocytes.

Pulsford *et al.*, (1994) ont mis en évidence chez la limande que le cortisol induirait une réduction du nombre de lymphocytes-B et T circulants. Le cortisol serait également responsable d'une induction de l'apoptose chez les lymphocytes-B, ce qui pourrait expliquer que ces cellules soient évacuées du sang après un stress (Verbrug-van Kemenade *et al.*, 1999).

Chez la carpe commune, le cortisol induit une réduction significative de la phagocytose et de la production des radicaux superoxydes. Cette inhibition se marque pour des concentrations avoisinant les 10nM (Yamagushi *et al.*, 2001). En addition de tout cela, le cortisol diminue l'activité des lymphocytes-B et la concentration des immunoglobulines circulantes (Nagae *et al.*, 1994).

## 4. Objectifs

Les objectifs de ce mémoire sont triples. Dans un premier temps, nous souhaiterions mettre en évidence un effet perturbateur potentiel de l'atrazine à doses subléthales sur le système de reproduction des juvéniles mâles et femelles du carassin doré.

Dans un deuxième temps, nous souhaiterions caractériser une éventuelle action modulatrice de l'atrazine sur le système immunitaire spécifique et non-spécifique des juvéniles.

Notre dernier objectif consiste à tenter de mettre en évidence une éventuelle différence de la réponse du système immunitaire des mâles et des femelles face à une intoxication chronique à l'atrazine.



Deuxième partie

## **Matériel et méthodes**



## Matériel et méthodes

### 1. Espèce ciblée

Le carassin doré *Carassius auratus auratus* Linnaeus (1758) fait partie de la famille des cyprinidés et de l'ordre des cypriniformes (figure 2.1). Il vit dans les rivières et les lacs aux eaux stagnantes et supporte des gammes de pH allant de 6.0 à 8.0 unités. D'un point de vue géographique, le carassin provient essentiellement des régions tropicales d'Asie mais il a été largement introduit partout dans le monde.

Le carassin doré atteint son âge de première maturité sexuelle à 1 an, mais celle-ci peut être retardée si les conditions environnementales sont défavorables. C'est un pondreur multiple à ovogenèse asynchrone. En effet, les femelles matures pondent entre 3 à 10 lots d'œufs sur une période d'une dizaine de jours. Les œufs sont déposés sur un substrat végétal et la fécondation est externe.

### 2. Contamination chronique

L'ensemble de l'expérience s'est déroulé au sein de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes (URBO) et consistait à contaminer de façon chronique (doses subléthales) des individus juvéniles mâles et femelles du carassin doré. Le toxique utilisé en vue de la contamination fut de l'atrazine Pestanal (Riedel-de-haën).

#### 2.1. Dispositif expérimental

Le schéma expérimental s'est présenté comme suit : 280 poissons mâles et femelles ont été répartis en trois groupes d'individus et ont été soumis à trois traitements expérimentaux différents, à savoir un groupe contrôle de 94 individus non intoxiqués, un groupe de 93 individus intoxiqués à raison de 10µg/l d'atrazine et un dernier groupe de 93 individus intoxiqués à raison de 100µg/l d'atrazine. L'ensemble de l'expérience s'est étalé sur une durée de 98 jours. Pendant toute cette période, les poissons ont été soumis à une photopériode de 16 heures de jour suivies de 8 heures de nuit et ont été nourris à raison d'une dose journalière calculée par rapport à la densité de poissons présente dans chaque bac. Les aliments utilisés sont des granulés commerciaux pour poissons (TRO,VIT,nutreco). Pour éviter un accroissement du stress lié aux conditions expérimentales, les poissons ont été acclimatés pendant les deux semaines qui ont précédé le début de la contamination.



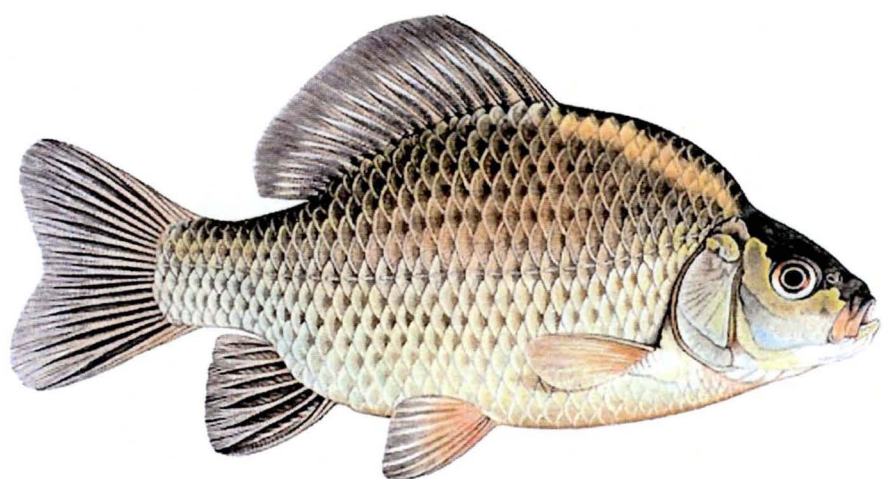


Fig. 2.1 *Carassius auratus*



Fig. 2.2 Systèmes ESKADA

Le système de bassins dans lequel sont placés les carassins se compose de trois ESCADA (figure 2.2). Chaque ESCADA comporte une série de 6 bacs en polyester d'une capacité de 120 l chacun. L'eau y circule en circuit fermé afin de conserver l'atrazine et s'épure de son contenu toxique en ammoniac et nitrite au sein d'un lit bactérien et ce, via une conversion métabolique en nitrate appelée nitrification. Le lit bactérien se développe sur des graviers argex et est recouvert d'une mousse filtrante. L'eau ainsi filtrée est pompée et renvoyée dans les différents bacs. L'oxygénation est, quant à elle, assurée par un système de pompe à air.

Différents paramètres physico-chimiques ont été contrôlés au cours du temps, à savoir les concentrations en azote ammoniacal, nitrites, et nitrates. Ces différentes mesures ont été effectuées une à deux fois par semaine sur base d'analyses spectrophotométriques (spectrophotomètre portable HACH 2010). La température, la concentration en oxygène dissout ainsi que le pH furent mesurés chaque jour à l'aide d'un pH-mètre (WTW pH330) et d'un oxymètre (WTW OX196). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.1.

## 2.2. Contamination des bassins par l'atrazine

Etant donné la faible solubilité de l'atrazine dans l'eau (70ppm), une dissolution préalable dans de l'acétone s'est avérée nécessaire pour optimiser la contamination (annexe 1). Notons que la quantité d'acétone déversée dans les bassins contenant 100µg/l d'atrazine le fut également dans les bassins contrôles.

Pour s'assurer que les poissons étaient bien soumis à une concentration constante en atrazine pendant toute la durée de la contamination, une vérification hebdomadaire par HPLC fut effectuée pour chacun des bassins. Dans un premier temps, on a procédé à une extraction (annexe 2) de l'atrazine dissoute sur cartouche (Waters Oasis HLB) puis, à une mesure de la concentration par HPLC (pompe Waters 600, détecteur PDA Waters 996, autosampler Waters 717, colonne Waters SymmetryShield RP18 5µM). Dans le cas d'une diminution de la contamination et, sur base de celle-ci, de l'atrazine était réintroduite dans les bassins concernés. La figure 2.3 illustre l'évolution de la concentration en atrazine dans les deux séries de bassins contaminés.

## 2.3. Prélèvements

Afin de mener à bien nos investigations, plusieurs séries de prélèvements aléatoires ont été effectuées et échelonnées selon le calendrier suivant :

- 21/01/02 : début de la contamination et prélèvement de 10 poissons contrôles ;
- 21/02/02 : prélèvement de 36 poissons répartis sur les trois séries de bassins ;
- 14/03/02 : prélèvement de 36 poissons répartis sur les trois séries de bassins ;
- 08/04/02 : prélèvement de 36 poissons répartis sur les trois séries de bassins ;



**Tableau 2.1.** Résultats des mesures physico-chimiques pour les 98 jours de la durée de l'expérience

a) Nitrites

Dose atrazine	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> - N (mg/l)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	NaNO <sub>2</sub> (mg/l)
0 µg/l	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,06
10 µg/l	0,03 ± 0,03	0,08 ± 0,08	0,14 ± 0,14
100 µg/l	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,09 ± 0,08

b) Azote ammoniacal

Dose atrazine	NH <sub>3</sub> -N (mg/l)	NH <sub>3</sub> (mg/l)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)
0 µg/l	0,16 ± 0,012	0,19 ± 0,14	0,20 ± 0,14
10 µg/l	0,39 ± 0,02	0,46 ± 0,19	0,49 ± 0,20
100 µg/l	0,34 ± 0,13	0,40 ± 0,14	0,42 ± 0,15

c) Nitrates

Dose atrazine	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> - N (mg/l)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)
0 µg/l	7,49 ± 4,45	33, 15 ± 20,07
10 µg/l	15,76 ± 13,64	57,72 ± 41,37
100 µg/l	11,67 ± 6,95	50,34 ± 29,48

d) pH, température et concentration en oxygène

Dose atrazine	pH	T(°C)	O <sub>2</sub> (mg/l)
0 µg/l	8,04 ± 0,13	21,02 ± 1,05	8,28 ± 0,90
10 µg/l	8,74 ± 0,09	21,52 ± 0,92	7,98 ± 0,76
100 µg/l	8,77 ± 0,14	21,44 ± 1,03	7,99 ± 0,94

- 29/04/02 : prélèvement de 36 poissons répartis sur les trois séries de bassins et fin de l'expérience de contamination.

Les poissons ont été pesés à l'aide d'une balance (Mettler AE200) d'une précision de 0,001g et mesurés au millimètre près grâce à une règle à butée.

Un prélèvement sanguin fut ensuite réalisé au moyen de seringues héparinées. Le sang fut placé dans des tubes à hémolyse et centrifugé à 4500 rpm pendant 20 minutes. Le plasma ainsi récolté fut aliquoté en vue des différents dosages et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  (stéroïdes sexuels) et  $-80^{\circ}\text{C}$  (autres dosages).

Dans un troisième temps, nous avons procédé à la décapitation des poissons préalablement assommés. Pour finir, les gonades ont été prélevées et pesées. Cette dernière étape nous a donc permis de sexer avec précision l'ensemble des individus prélevés.

### 3. Paramètres étudiés

Quatre catégories de paramètres ont été choisies afin de caractériser au mieux la problématique étudiée.

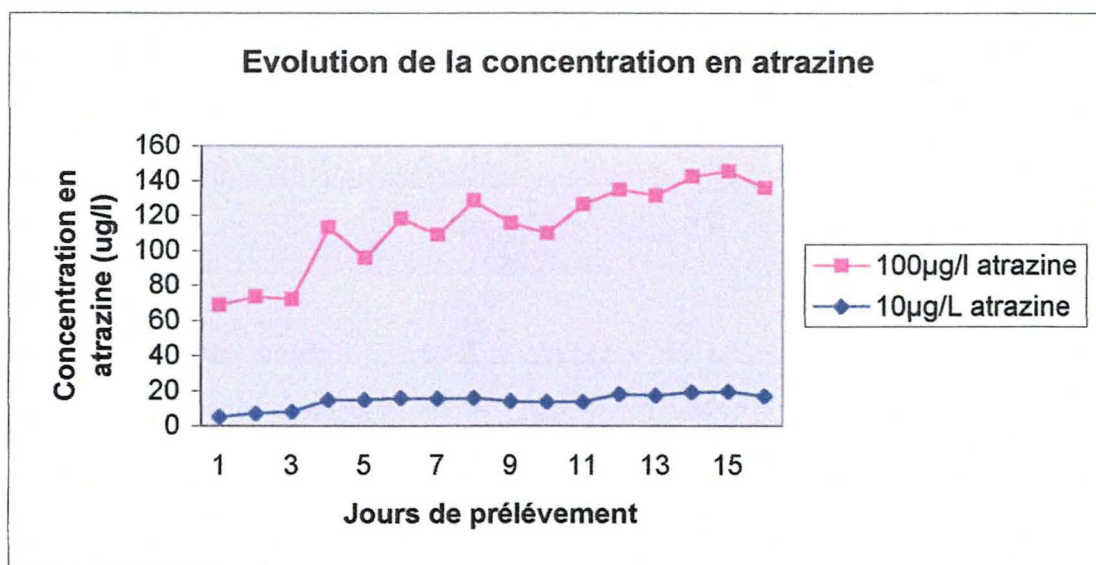
#### 3.1. Paramètre morphométrique

Nous avons mentionné au point 2.3 qu'une mesure du poids total du corps ainsi qu'une mesure du poids des gonades ont été réalisées. Cette étape nous a permis de collecter les données nécessaires au calcul du rapport gonadosomatique (RGS). Cette étude du RGS est incontournable car elle est simple, et peut souvent rendre compte d'une éventuelle altération de la fonction reproductive. De plus, il est rapporté dans bon nombre de publications que le RGS de poissons téléostéens soumis à une contamination chronique par un toxique est généralement plus faible que le RGS d'individus contrôles non contaminés.

Le RGS se calcule par le rapport (exprimé en pourcentage) entre le poids des gonades (**G** en g) et le poids total du poisson (**P** en g) :

$$\text{RGS} = (\text{G/P}) * 100$$





**Figure 2.3.** Evolution de la concentration en atrazine au cours du temps dans les différents bassins

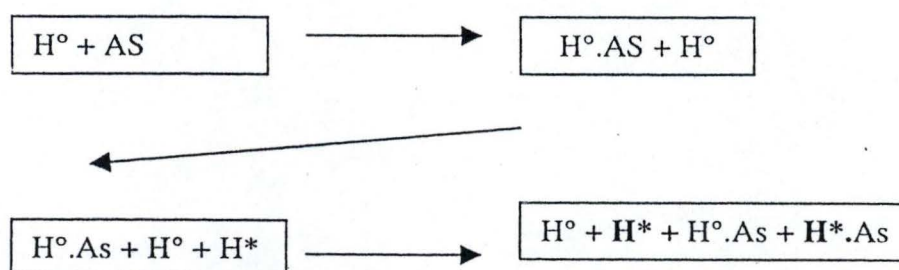
### 3.2. Paramètres hormonaux

#### 3.2.1. Dosage des stéroïdes sexuels : testostérone, 11-kétotestostérone et 17 $\beta$ -oestradiol

Le dosage des stéroïdes sexuels s'effectue selon une méthode radioimmunologique (radioimmunoassay : RIA). Le protocole utilisé est décrit par Fostier et Jalabert (1986).

##### A. Principe

Le principe d'un dosage par RIA consiste à créer une compétition entre une hormone marquée ( $H^*$ ) par un isotope radioactif ( $H^3$  ou  $I^{125}$ ) et une hormone froide ( $H^\circ$ ) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillon) et ce, vis-à-vis d'un anticorps spécifique ( $As$ ). La figure ci-jointe illustre de manière schématique le principe susmentionné.



Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps qui lui est spécifique. Elle se retrouve ainsi sous forme libre ou complexée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée restant constante, toute augmentation de la concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée liée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. On peut dès lors mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et par cette mesure, calculer la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps et ce, en présence d'une quantité progressivement croissante en hormone froide.

##### B. Méthode

Premièrement, on procède à une double extraction (annexe 3) de l'hormone à doser. Cette étape est importante dans le cas des stéroïdes car elle permet, par addition de solvants, de



produire une rupture des liaisons hormone-protéine. Cette première étape terminée, on effectue la compétition entre l'hormone froide (standard ou échantillon) et l'hormone marquée vis-à-vis de l'anticorps. Après une incubation de 12 heures à 4°C, la séparation entre l'hormone marquée libre et l'hormone marquée fixée à l'anticorps se fait par centrifugation, décantation et rinçage. La dernière partie du dosage consiste à mesurer la radioactivité émise (cpm) par chacun des tubes. Cette mesure est effectuée par un compteur  $\beta$  (BECKMAN LS 6000IC). Un système de calcul présenté par Fostier et Jalabert (1986) permet la transformation des valeurs exprimées en cpm en valeurs exprimées en pg/tube. La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Conc. (pg/ml)} = \frac{\text{Conc. (pg/tube)} * \text{quantité de tampon reprise des stéroïdes extraits (\mu l)}}{\text{Quantité de plasma utilisée pour le dosage (\mu l)} * \text{quantité de plasma extraite (\mu l)}}$$

Notons que les mesures sont faites en duplicata pour chacun des échantillons et en triplicata pour chacun des points de la courbe standard. De plus, pour chaque hormone, on réalise une mesure de la radioactivité naturelle (background) ainsi qu'une mesure de la fixation totale.

L'intégralité du protocole ainsi que les diverses références concernant la provenance des produits utilisés (hormones marquées, hormones froides et anticorps) sont annexés en fin de travail (annexe 4).

### 3.3. Paramètres caractérisant le stress

#### 3.3.1. Dosage du cortisol

Le dosage du cortisol s'effectue par RIA suivant le même principe illustré pour le dosage des stéroïdes sexuels. Pour ce faire, un kit d'analyse RIA est utilisé (Spectria CORTISOL [ $^{125}\text{I}$ ] coated Tube Radioimmunoassay, Orion Diagnostica). La radioactivité émise est mesurée à l'aide d'un compteur  $\gamma$ .

#### 3.3.2. Dosage du glucose

Il s'agit d'un dosage par voie enzymatique faisant intervenir la glucose oxydase (GOD) et la peroxydase (POD). La méthode a été élaborée par Trinder (1969).

### A. Principe

Le dosage du D-Glucose par la GOD et la POD se fait en 2 réactions. La première correspond à l'oxydation du D-Glucose via l'action de la GOD. Cette oxydation entraîne la formation de D-glucono-1,4-lactone et d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Notons que la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  produite dépend de la concentration en D-glucose présente dans l'échantillon ou le standard.

La deuxième réaction ou réaction indicatrice est moins spécifique et correspond à l'oxydation du chromogène via l'action de la POD. Le chromogène oxydé se colore et permet une lecture par spectrophotomètre.

### B. Méthode

Tout d'abord, on réalise une courbe standard (triplicata) comprenant 7 niveaux de dilution, les différents points sont choisis en fonction des niveaux en glucose connus chez différentes espèces de poisson. Ensuite, on procède à une déprotéinisation du plasma (échantillons en duplicata), du blanc (tampon 0,1M) et des différents standards. La déprotéinisation est réalisée par acidification grâce à l'acide perchlorique. Le surnageant de déprotéinisation est ensuite utilisé pour la réaction chromogène illustrée ci dessous. Une fois celle-ci terminée, on mesure de la densité optique (DO) à 436nm au moyen d'un spectrophotomètre (BECKMAN DU 640). L'intégralité du protocole et les références quant aux différents produits utilisés sont annexés en fin de travail (annexe 5).

### C. Calcul de la droite de régression et des résultats

La droite de régression est calculée sur base de la moyenne des différents standards desquels on a préalablement déduit la valeur du blanc. Les données ont ensuite été introduites dans le programme *Microsoft Excel*. L'équation de la droite nous permet ensuite d'évaluer la concentration en glucose dans chacun des échantillons et ce, sur base de la moyenne des différentes DO obtenues.

#### 3.3.3. Osmolarité

L'osmolarité (mOsm) est mesurée sur base du plasma à l'aide d'un osmomètre (FISKE One-ten osmometer).



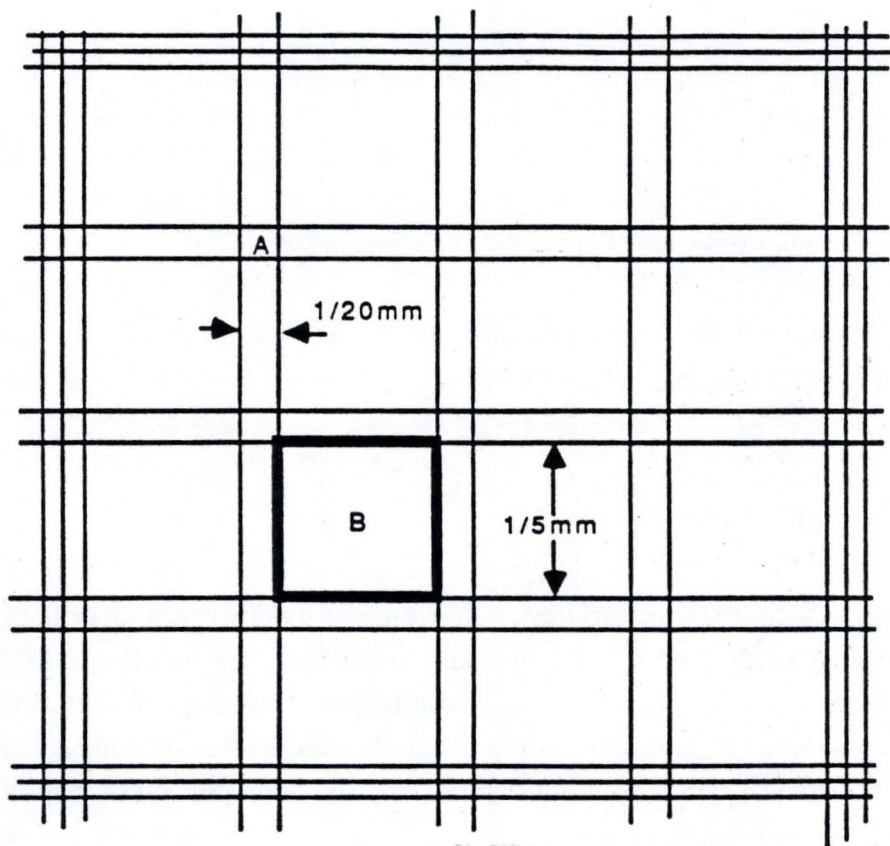


Figure 2.4. Représentation schématique d'une cellule de Burker

### 3.4. Paramètres immunitaires

#### 3.4.1. Comptage des cellules lymphocytaires

L'évaluation du nombre de cellules lymphocytaires se fait par comptage optique à l'aide d'un microscope.

##### A. Principe

Le comptage des globules lymphocytaires se réalise avec du sang hépariné dans une chambre hématimétrique ou cellule de Burcker (figure 2.4). Chaque comptage est effectué le jour même des prélèvements.

##### B. Méthode

Dans un premier temps, 10 µl de sang sont prélevés et dilués dans 490 µl de tampon PBS. Les solutions sont vortexées jusqu'à obtention d'une bonne homogénéisation. Ensuite, on reprend 10 µl de l'homogénat que l'on place dans les deux zones quadrillées de la cellule de Burcker réservées à cet effet. La dernière étape consiste à évaluer avec précision le nombre de cellules lymphocytaires se trouvant dans 5 carrés de type B (grand carré). Pour ce faire, on réalise un comptage visuel à l'aide d'un microscope optique.

##### C. Calcul des résultats

Dans un premier temps, on effectue la somme du nombre de lymphocytes comptés dans chacun des carrés de type B. La concentration réelle en lymphocytes dans le sang est évaluée grâce à l'application de la formule suivante :

$$\text{Concentration en lymphocytes / mm}^3 = \frac{\sum_{\text{obs}}}{10} \cdot 50 \cdot 25000$$

Où 50 correspond au facteur de dilution et 250 au volume d'homogénat délimité par la surface quadrillée.

#### 3.4.2. Dosage du lysozyme

L'évaluation de la concentration en lysozyme se base sur une analyse spectrophotométrique. Le protocole utilisé se réfère à une publication de Lange (2001).



### A. Principe

L'action lytique du lysozyme sur les bactéries est utilisée en vue de son dosage dans le plasma. En effet, une suspension bactérienne d'une DO connue verra celle-ci diminuée de façon proportionnelle à la concentration en lysozyme qu'on serait susceptible de lui ajouter. Plus la concentration en lysozyme est élevée, plus la dégradation bactérienne est importante et plus la DO de la suspension bactérienne diminue.

### B. Méthode

En premier lieu, on réalise un blanc sur base de 25 µl de plasma de chacun des échantillons (le facteur de dilution est le même que celui utilisé lors du dosage proprement dit). On mesure la DO pour une longueur d'onde de 590 nm au moyen d'un lecteur ELISA (Packard Spectra count<sup>TM</sup>). Une fois la mesure du blanc effectuée, on utilise une suspension bactérienne de *Micrococcus luteus* à laquelle on ajoute 25 µl de plasma ou 25 µl de différentes solutions standards en lysozyme. On effectue la lecture de la DO (en duplicata) à 590 nm le plus vite possible. L'intégralité du protocole et les références quant aux différents produits utilisés sont annexés en fin de travail (annexe 6).

### C. Calcul de la courbe standard et des résultats

Une courbe standard comprenant 7 concentrations connues en lysozyme est réalisée en triplicata pour chaque série d'échantillons. La courbe décrivant la cinétique de dégradation du *Micrococcus* par le lysozyme se base sur la moyenne des trois DO mesurées pour chacune des 7 concentrations est calculée via le logiciel *Delta SOFT II*. L'équation de la courbe nous permet ensuite de calculer la concentration en lysozyme de chacun des échantillons sur base de la moyenne des 2 DO mesurées.

## 3.4.3. Quantification de l'activité des leukocytes phagocytaires

La quantification de l'activité des macrophages se fait par mesure spectrophotométrique. Le protocole utilisé se base sur une publication de Rook *et al.*, (1985).

### A. Principe

Les macrophages et PMN présentent une activité anti-bactérienne pouvant se marquer, lors de l'explosion oxydative, par une production de radicaux superoxydes  $^{\circ}\text{O}_2$  à partir d'oxygène et d'électrons provenant du NADPH.

Le principe du dosage se base sur la réduction d'un chromogène, le nitrobleu tetrazolium (NBT), par les anions superoxydes. Le produit issu de cette réduction se colore en mauve. On peut donc mesurer une DO par analyse spectrophotométrique.

### *B. Méthode*

Le dosage de la réduction du NBT s'effectue sur un échantillon sanguin. Nous avons dès lors procédé à cette analyse le jour même de nos prélèvements. Dans un premier temps, une courbe standard comprenant 6 niveaux de dilution est réalisée en triplicata. Pour ce faire, un poisson est prélevé au hasard et sert de référentiel. Une fois le sang prélevé, celui-ci est aliquoté afin d'obtenir 50 µl de sang pour chacun des points de la courbe. A ces 50 µl, on ajoute différentes concentrations standards en NBT. Après une période d'incubation, on récupère 50 µl de suspension préalablement passée au vortex. A cette fraction, on ajoute 1ml de formamide ce qui dans un premier temps bloque la réaction et dans un second temps la révèle. Après une centrifugation à 9500 rpm pendant 15 minutes, on récupère 800 µl de surnageant et on lie la DO à 620 nm. La méthodologie suivie pour le dosage de l'activité du NBT sur les échantillons est globalement la même que celle illustrée pour les standards. L'intégralité du protocole ainsi que les références des différents produits utilisés sont annexés en fin de travail.

### *C. Calcul de la courbe standard et des résultats*

Une courbe standard comprenant 6 concentrations connues en NBT est réalisée en triplicata pour chaque série d'échantillons. La droite de régression logarithmique décrivant la réduction du NBT par les ions superoxydes se base sur la moyenne des trois DO mesurées pour chacune des 6 concentrations connues en NBT.



Troisième partie

## **Résultats**



## Résultats

Au début de nos investigations, nous souhaitions mettre en évidence une éventuelle influence de l'atrazine à doses subléthales sur le système reproducteur et le système immunitaire du carassin doré. Dans un deuxième temps, un traitement statistique des différentes données relatives aux mâles et aux femelles nous aurait permis de caractériser un effet délétère de l'atrazine spécifique au sexe.

Malheureusement, les informations caractérisant les individus du sexe mâle n'ont pu être individuellement analysées. En effet, nous avons rencontré un important problème de sex-ratio au trop grand avantage des femelles. Par conséquence une analyse globale incluant les données relatives aux mâles et femelles a été menée et ce, en parallèle à une investigation individuelle des informations relatives aux femelles.

### 1. Le taux de survie

La mortalité des poissons se trouvant dans les différents bassins a été globalement très faible tout au long des 98 jours de la durée de l'expérience. Le tableau 3.1 reprend les différentes valeurs du taux de survie cumulé pour les différents bassins à échéance des différentes dates de prélèvements. Signalons cependant que les poissons du groupe contrôle présentèrent, dans les premiers jours de l'expérience, une mortalité plus importante faisant probablement suite aux manipulations engendrées par la constitution de lots équivalents. Un traitement global au NaCl à la dose de 3 g/l sur une durée de 5 jours a suffi pour stopper le développement d'une pathologie dans les bassins concernés. Les poissons contaminés par de l'atrazine ont, quant à eux, présentés une mortalité très faible sur l'ensemble de l'expérience.

**Tableau 3.1.** Taux de survie cumulé de chacun des bassins à échéance des différentes dates de prélèvements. Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

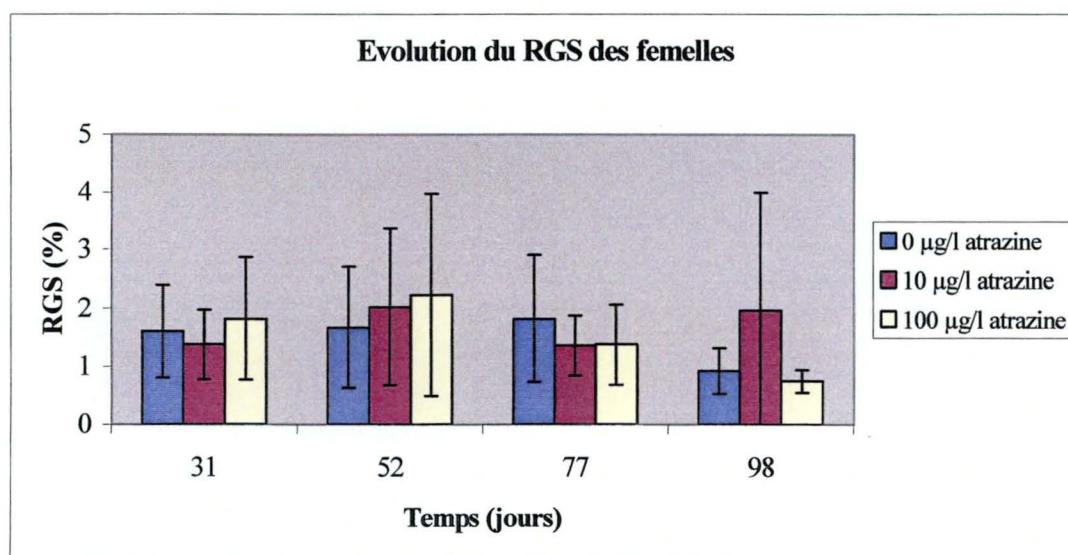
	31 j	52 j	77 j	98 j
0 µg/l atrazine	78,16	78,16	78,16	78,16
10 µg/l atrazine	93,1	93,1	93,1	93,1
100 µg/l atrazine	89,53	83,07	83,07	83,07



## 2. Paramètres morphométrique et histologique

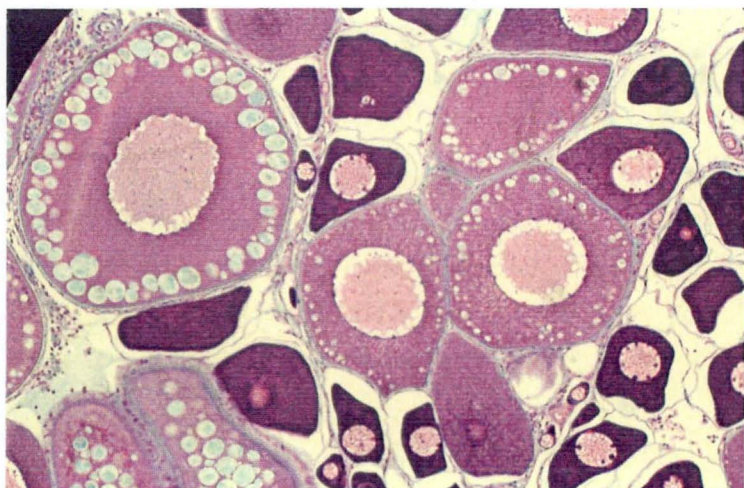
Le calcul du RGS des femelles servant de contrôle et des femelles intoxiquées à 10 et 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine a été effectué après 31, 52, 77 et 98 jours de contamination. Un minimum de 5 observations pour chaque bassin (0, 10, 100  $\mu\text{g/l}$  atrazine) et à chaque date de prélèvement ont été réalisées. Douze séries de données nous ont donc permis, sur base d'un calcul des moyennes et écart-types, de caractériser l'évolution du RGS au cours du temps.

De cette étude comparative il ressort que le RGS moyen des femelles (Figure 3.1) après 31 jours d'expérience se situe entre  $1,38 \pm 0,60$  et  $1,82 \pm 1,04$  % et ce, tout traitement confondu. Par la suite, une légère augmentation peut être observée. On remarque notamment un RGS de  $2,24 \pm 1,74$  % après 52 jours chez les femelles contaminées par 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine. L'analyse statistique des données par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre cependant qu'il n'existe aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les différentes séries de données. A la vue des différents résultats obtenus nous pouvons avancer que les femelles n'ont globalement pas atteint la maturation sexuelle. Cependant, des écarts-types élevés peuvent être observés pour divers lots et seraient le résultat d'un début de maturation chez certaines femelles. Une visualisation de coupes histologiques des gonades nous a confirmé que dans la très grande majorité, les femelles ne présentent pas un développement ovarien très avancé mais qu'effectivement, certaines ont entamé un début de maturation.

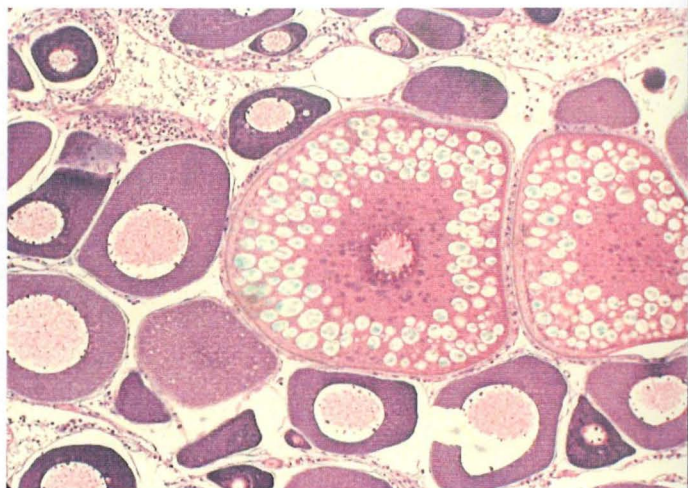


**Figure 3.1.** Evolution du RGS des femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types.

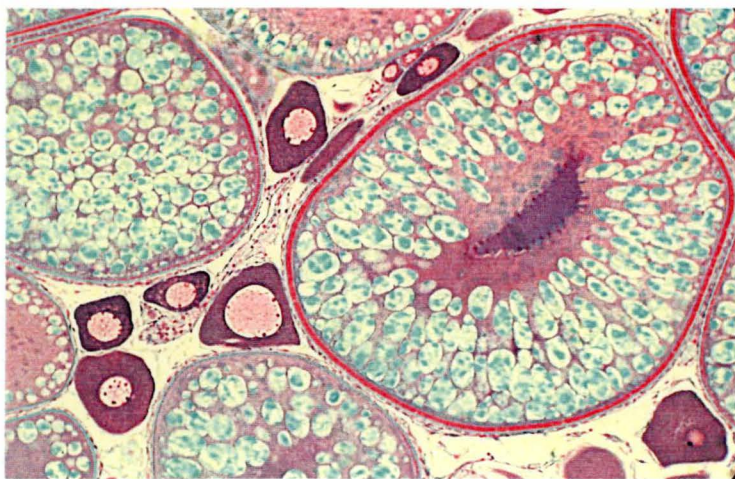




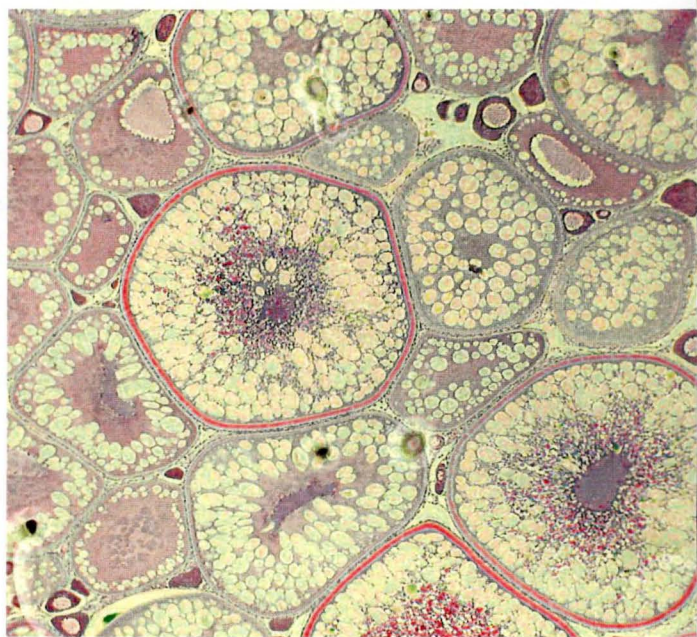
1



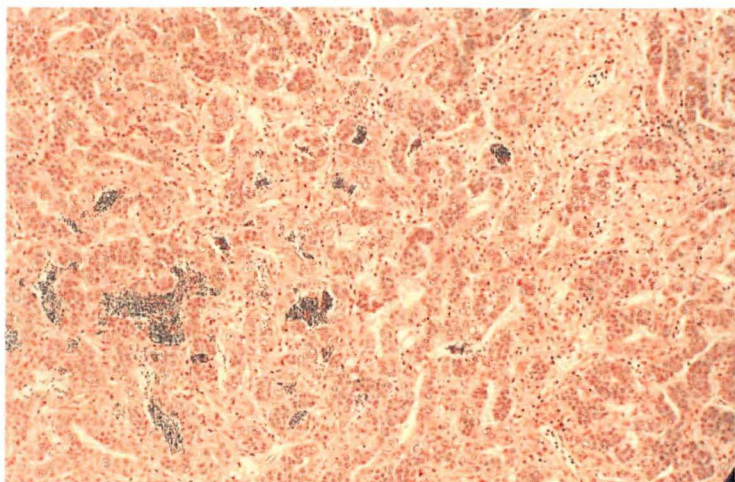
2



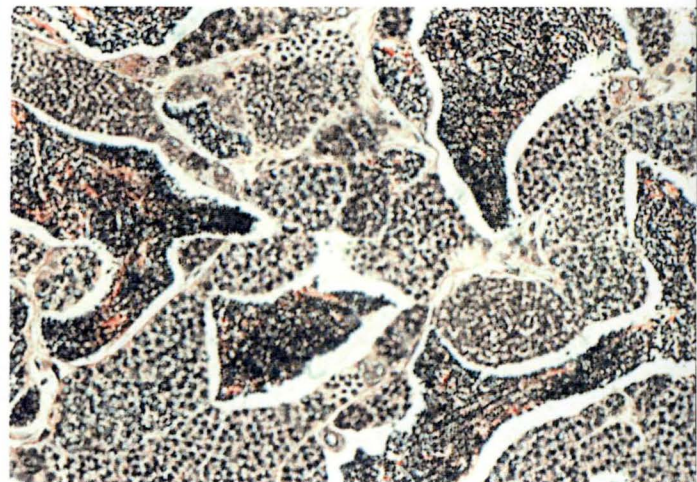
3



4



5



6



La réalisation de coupes histologiques de gonades pour chacun des individus nous a permis de mettre en évidence les stades les plus avancés du développement des gonades tout au long de l'expérience. La planche histologique ci-jointe illustre les différents résultats obtenus au cours du temps

**Planche 1.** Photos 1 et 2. Ovaire de carassin doré contenant des ovocytes protoplasmiques et en début de vitellogenèse endogène. Photo 3. Ovocytes en fin de vitellogenèse endogène. Photo 4. Ovocytes en début de vitellogenèse exogène. Photo 5. Testicule en début de spermiogenèse, avec présence de quelques spermatozoïdes dans les lobules. Photo 6. Testicule en spermiogenèse, avec lobules remplis de spermatozoïdes.

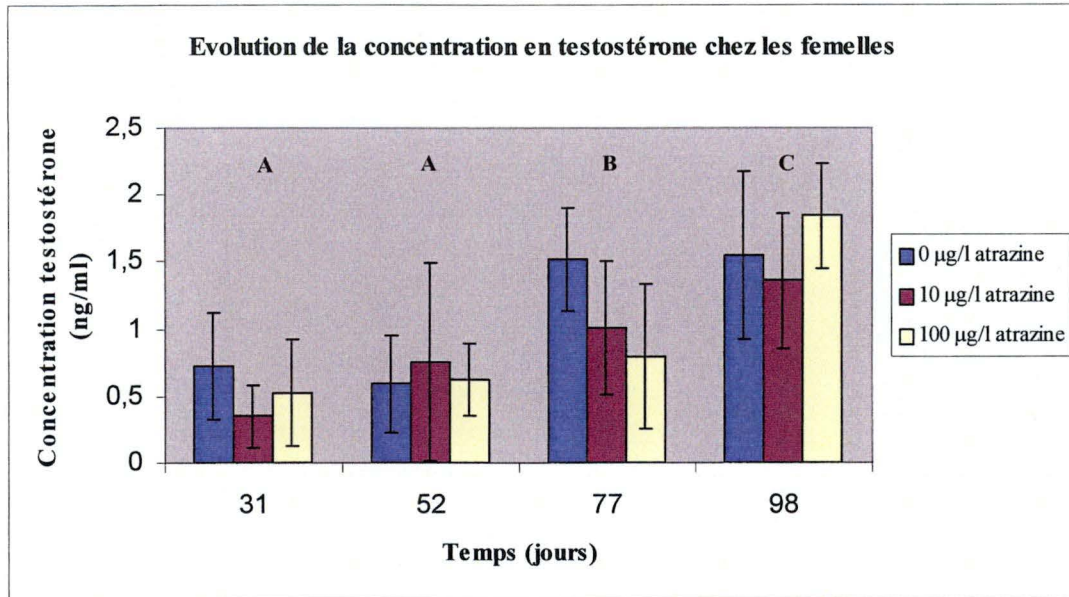
### 3. Les stéroïdes sexuels

L'évolution de la concentration en stéroïdes sexuels au cours du temps et pour les différents traitements n'a été investiguée que pour les femelles. Comme susmentionné, trop peu de données relatives aux mâles ne nous ont pas permis de réaliser une analyse statistique les concernant.

#### 3.1. La testostérone

L'évaluation de la concentration en testostérone chez les femelles servant de contrôle et chez les femelles intoxiquées à 10 et 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine a été effectuée après 31, 52, 77 et 98 jours de contamination. Un minimum de 3 observations pour chaque bassin (0, 10, 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine) et à chaque date de prélèvements a été réalisé. L'ensemble des données collectées nous a permis, sur base d'un calcul des moyennes et écarts-types, de caractériser l'évolution de la concentration en testostérone chez les femelles tout au long de l'expérience.

Globalement, bien que restant très faible, la concentration en testostérone chez les femelles augmente au cours du temps (figure 3.2). Après 31 jours d'expérimentation, les valeurs obtenues pour les différents traitements se situent en moyenne entre  $0,351 \pm 0,238$  et  $0,727 \pm 0,399$  ng/ml. Au 77<sup>ème</sup> jour, on atteint des niveaux un peu plus élevés tournant en moyenne entre  $0,793 \pm 0,281$  et  $1,515 \pm 0,382$  ng/ml. A la fin de l'expérience, les concentrations en testostérone dépassent le ng/ml et ce, pour une majorité des femelles prélevées.



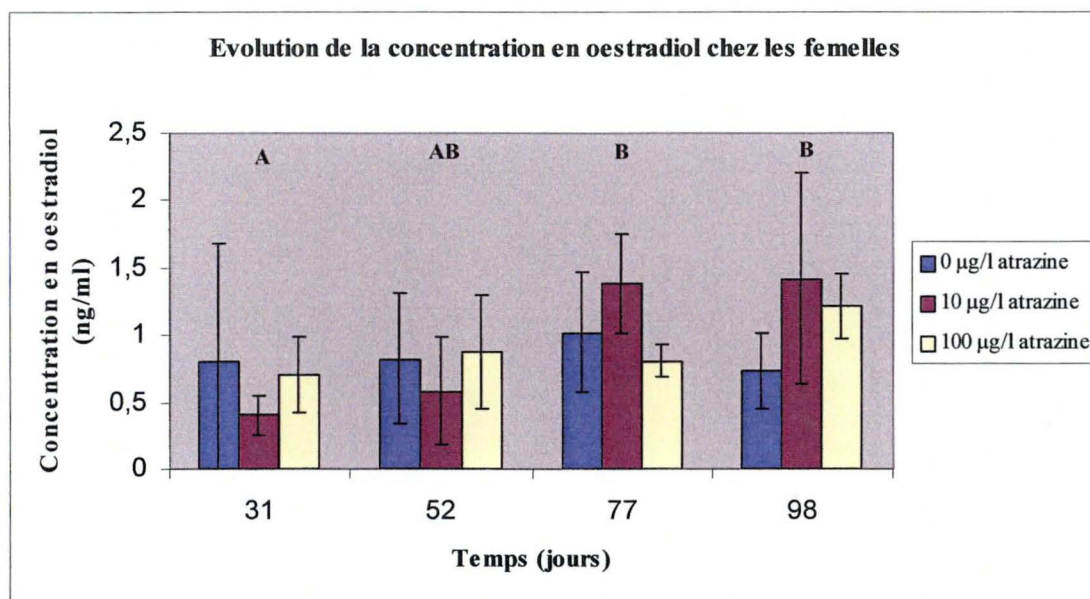
**Figure 3.2.** Evolution de la concentration en testostérone chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B,C) ne sont pas significativement différentes, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique des données par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre qu'il existe bien un effet significatif ( $p < 0,05$ ) du temps sur la concentration en testostérone. Aucun effet de la dose en atrazine ni d'interaction avec le temps n'a cependant pu être mis en évidence par l'ANOVA. De ce fait, nous nous sommes limités à un test d'égalité des moyennes portant sur le critère du temps. Il découle de cette analyse que la concentration en testostérone chez les femelles prélevées après 31 et 52 jours est significativement différente de la concentration mesurée après 77 et 98 jours d'expérimentation. On peut également noter que la concentration en testostérone chez les femelles prélevées au 77<sup>ème</sup> jour de la contamination est significativement différente de celle mise en évidence au 98<sup>ème</sup> jour.

### 3.2. L'oestradiol

A l'instar de la testostérone, l'évolution de la concentration en oestradiol chez les femelles a été investiguée pour les trois traitements ainsi que pour les différentes dates de prélèvement. Un minimum de 3 observations pour chaque bassin et date nous a permis, sur base d'un calcul des moyennes et écarts-types, de caractériser l'évolution de la concentration de l'oestradiol. Globalement, bien qu'étant très faibles, les concentrations plasmatiques en oestradiol semblent montrer une légère croissance au cours du temps (Figure 3.3). Les valeurs moyennes pour le premier prélèvement se situent entre  $0,407 \pm 0,151$  et  $0,808 \pm 0,871$  ng/ml et ne s'élèvent que très légèrement après 52 jours. Les concentrations moyennes en oestradiol inhérentes au dernier prélèvement se situent entre  $0,736 \pm 0,281$  et  $1,419 \pm 0,787$  ng/ml.





**Figure 3.3.** Evolution de la concentration en oestradiol chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique des données par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre qu'il existe un effet significatif du temps ( $p < 0,05$ ) sur la concentration en oestradiol. Aucun effet significatif de la dose en atrazine ne peut être démontré. Cependant, une interaction significative entre les deux critères peut être avancée.

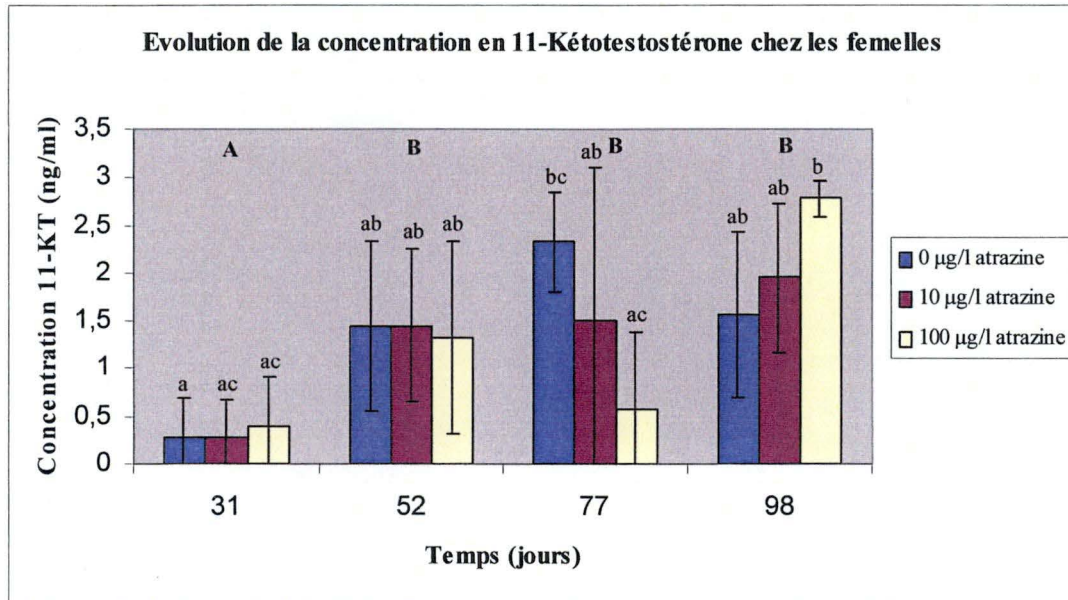
Un test d'égalité des moyennes a donc été effectué sur base du temps. Les résultats révèlent qu'il n'existe qu'une seule différence significative et ce, entre les valeurs obtenues après 31 jours d'expérimentation d'une part, et celles obtenues après 77 et 98 jours. Le test d'égalité des moyennes prenant en considération l'interaction du temps et de la dose ne nous montre aucune différence significative entre les différents jeux de données.

### 3.3. La 11-Ketotestostérone

Tout comme les deux autres hormones sexuelles, l'évolution de la 11-Kétotestostérone a été caractérisée pour l'ensemble des traitements et aux différentes dates de prélèvements. Un minimum de 3 observations par traitement et par date nous a permis de calculer les moyennes et écarts-types servant à caractériser l'évolution des taux plasmatiques en 11-Kétotestostérone chez les femelles du contrôle et chez celles contaminées.

De nouveau, en ce qui concerne cette 3<sup>ème</sup> hormone, on peut remarquer que les concentrations restent très faibles mais qu'elles évoluent à la hausse au cours du temps (figure 3.4). Cette évolution se marque notamment entre le premier et les trois autres prélèvements. En effet, des concentrations moyennes se situant entre  $0,279 \pm 0,413$  et  $0,398 \pm 0,519$  ng/ml sont trouvées

après 31 jours d'expérimentation alors que celles mises en évidence pour les autres dates dépassent, pour la plupart, le ng/ml. Des valeurs égales à  $2,324 \pm 0,519$  et  $2,780 \pm 0,019$  sont respectivement trouvées après 77 et 98 jours d'expérimentation.



**Figure 3.4.** Evolution de la concentration en 11-kétotestostérone pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Les catégories partageant au moins une lettre (a,b,c) ne sont pas significativement différentes pour les critères dose et temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique des données par ANOVA2 (2 critères de classification croisés fixes) confirme nos observations. En effet, le test d'égalité des variances nous révèle qu'il existe bien une influence significative du temps mais aucune de la dose. Le test de Scheffé nous montre, quant à lui, que les concentrations observées pour la première date de prélèvement sont bien significativement différentes des trois autres. En plus d'une influence du temps, une interaction entre le temps et la dose peut également être avancée. Le test d'égalité des moyennes sur les deux critères du temps et de la dose nous montre que les différences significatives entre les douze jeux de données se situent principalement entre d'une part, les trois traitements du jour 31 et d'autre part, le contrôle du jour 77 et le bac contaminé par 100 µg/l d'atrazine du jour 98.

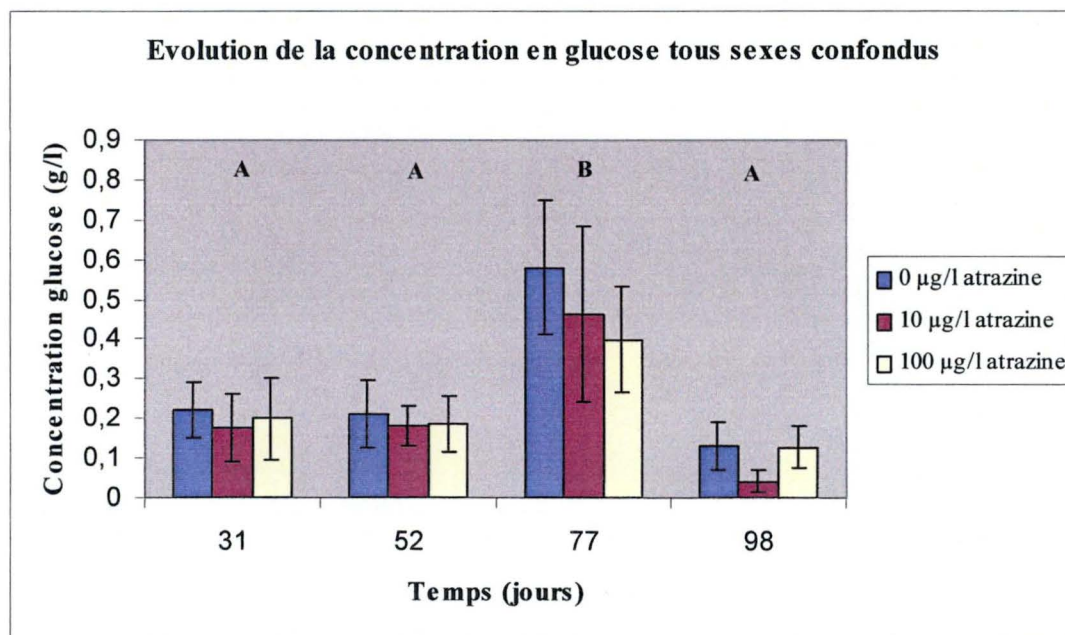
## 4. Les indicateurs de stress

### 4.1. Le glucose

La concentration plasmatique en glucose chez les poissons tous sexes confondus et chez les femelles a été mesurée pour l'ensemble des traitements et dates de prélèvements. Lorsque les



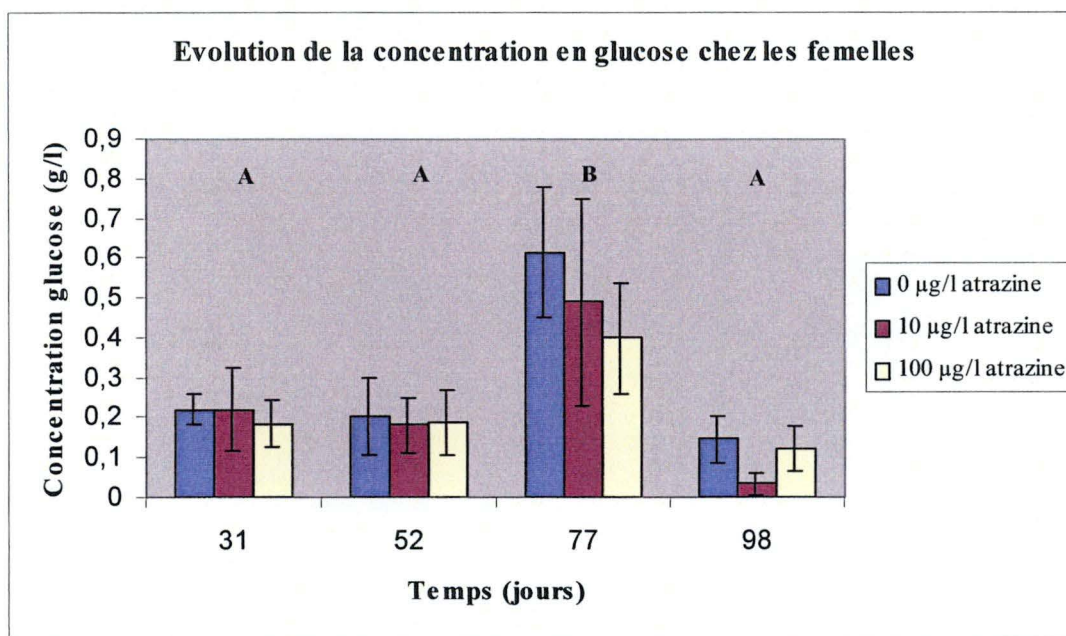
données sont traitées dans leur globalité, on ne remarque pas d'évolution de la concentration en glucose pendant les 52 premiers jours (figure 3.5). Les concentrations mesurées pendant cette période varient entre  $0,17 \pm 0,08$  et  $0,22 \pm 0,06$  mg/ml pour le 31<sup>er</sup> jour. Il en va de même pour les concentrations mesurées au 52<sup>ème</sup> jour qui ne dépassent pas les  $0,180 \pm 0,07$  g/l de glucose. Après 77 jours d'expérimentation, une élévation de la concentration en glucose s'observe pour l'ensemble des traitements, avec des valeurs oscillant entre  $0,40 \pm 0,13$  et  $0,58 \pm 0,17$  g/l de glucose. Cette élévation est suivie, au 98<sup>ème</sup> jour, par un retour à des concentrations plus faibles ne dépassant pas les  $0,13 \pm 0,06$  g/l de glucose.



**Figure 3.5.** Evolution de la concentration en glucose tous sexes confondus pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

Le traitement statistique des données par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) suivi du test d'égalité des moyennes pour le critère du temps nous confirment que les concentrations en glucose observées au 77<sup>ème</sup> jour sont bien significativement différentes de celles observées pour les 3 autres dates de prélèvements. Aucun effet significatif de la dose ni d'interaction avec le temps n'ont cependant pu être mis en évidence par les différents tests statistiques.

Le traitement séparé des données relatives aux femelles nous montre exactement le même schéma que celui susmentionné (figure 3.6). On observe bien une augmentation significative de la concentration en glucose au 77<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Les valeurs des différentes moyennes et écarts-types se trouvent dans une fourchette équivalente à celle mise en évidence lors du traitement global des données. Les tests statistiques nous confirment bien que le temps est le seul facteur ayant une influence significative sur l'évolution des concentrations en glucose chez les femelles.



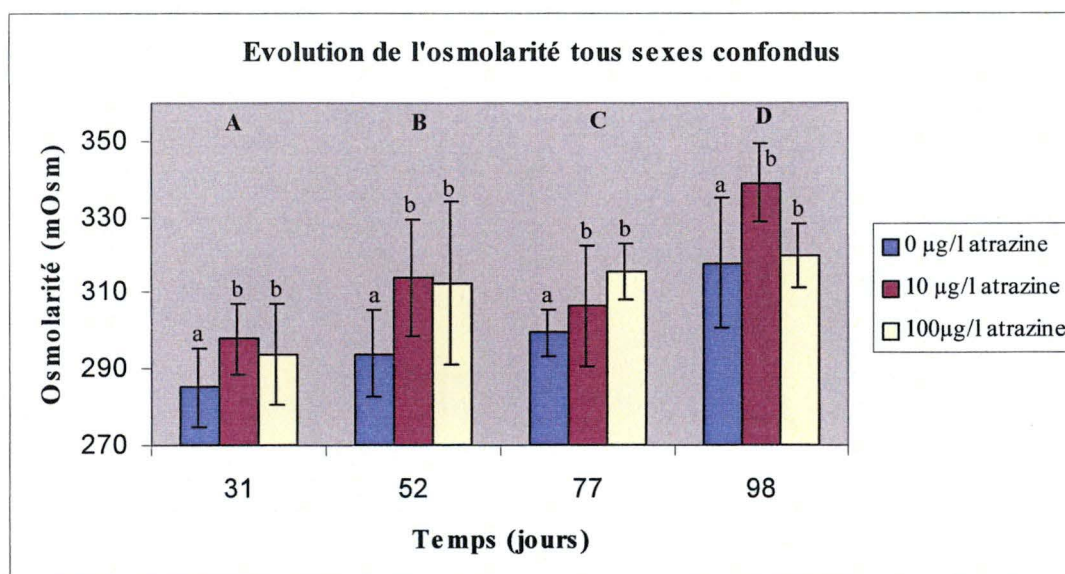
**Figure 3.6.** Evolution de la concentration en glucose chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B,) ne sont pas significativement différentes, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

## 4.2. L'osmolarité

L'osmolarité du plasma des poissons tous sexes confondus a été investiguée après 31, 52, 77 et 98 jours de contamination et ce, pour les différents traitements. L'analyse des données individuelles relatives aux femelles a été effectuée après 31, 52, et 77 jours d'expérimentation. En effet, un nombre insuffisant de données pour le 98<sup>ème</sup> jour ne nous a pas permis d'inclure les différentes valeurs dans le test statistique.

Globalement, une augmentation de l'osmolarité peut s'observer sur l'ensemble de la durée de l'expérience (figure 3.7). En effet, les valeurs obtenues pour le 31<sup>ème</sup> jour varient en moyenne entre  $285,09 \pm 10,81$  et  $293,82 \pm 13,47$  mOsm, alors que les valeurs d'osmolarité observées après 98 jours d'expérience varient entre  $317,80 \pm 17,08$  et  $340,00 \pm 12,49$  mOsm. De plus, les valeurs les plus élevées s'observent chez les individus intoxiqués par 10 et 100 µg/l d'atrazine.



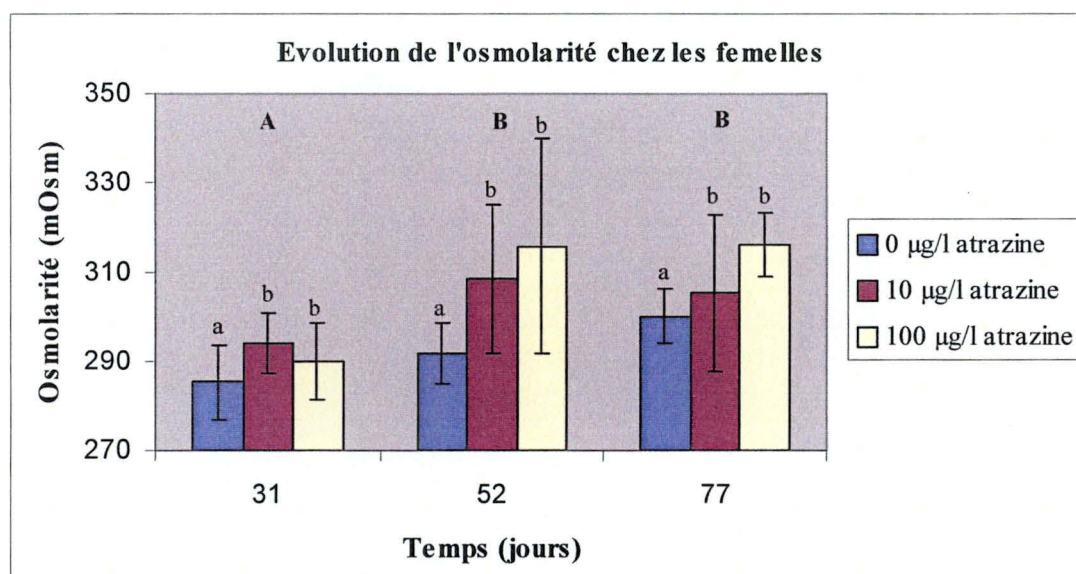


**Figure 3.7.** Evolution de l'osmolarité tous sexes confondus pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B,C,D) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Les catégories partageant au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différentes pour le critère dose, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre qu'il existe bien un effet significatif du temps ( $p < 0,05$ ) sur l'osmolarité ainsi qu'un effet significatif ( $p < 0,05$ ) de la dose en atrazine. Par ailleurs, aucune interaction entre le temps et la dose n'a pu être mise statistiquement en évidence ( $p > 0,05$ ).

Un test d'égalité des moyennes (test de Scheffé) portant sur la dose et le temps nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différents jeux de données. Il apparaît que les valeurs d'osmolarité sont significativement différentes pour les 4 dates de prélèvements (31 j  $\neq$  52j  $\neq$  77 j  $\neq$  98 j). De plus, les poissons contrôles présentent des valeurs d'osmolarité significativement ( $p < 0,05$ ) plus faibles que celles observées chez les poissons intoxiqués par 10 et 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine. Signalons également qu'aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) ne permet de discriminer les poissons intoxiqués par 10 et 100  $\mu\text{g/l}$  d'atrazine.

Les données relatives aux femelles nous montrent une même évolution de l'osmolarité que celle mise en évidence sans discrimination du sexe (Figure 3.8). En effet, les valeurs d'osmolarité moyennes chez les femelles prélevées au 31<sup>ème</sup> jour se situent entre  $285,17 \pm 8,37$  et  $299,89 \pm 6,15$  mOsm, puis elles augmentent au 77<sup>ème</sup> jour pour atteindre des moyennes se situant entre  $290,00 \pm 8,64$  et  $315,88 \pm 24,27$  mOsm. De nouveau, les femelles intoxiquées présentent des niveaux d'osmorégulation plus élevés que ceux mis en évidence chez les femelles du groupe contrôle.



**Figure 3.8.** Evolution de l'osmolarité chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Les catégories partageant au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différentes pour le critère dose, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre qu'il existe également un effet significatif ( $p < 0,05$ ) du temps et de la dose en atrazine. De plus, aucune interaction entre le temps et la dose n'a pu être mise statistiquement en évidence ( $p > 0,05$ ). Le test d'égalité des moyennes (test de Scheffé) portant sur la dose et le temps nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différents jeux de données. Il apparaît que les valeurs d'osmolarité sont significativement différentes entre le 31<sup>e</sup> jour et les deux autres dates de prélèvements. Cependant, aucune différence significative entre le 52<sup>e</sup> et le 77<sup>e</sup> jour n'a pu être avancée. De plus, les femelles contrôles présentent des valeurs d'osmolarité significativement ( $p < 0,05$ ) plus faibles que celles observées chez les femelles intoxiquées par 10 et 100 µg/l d'atrazine. Signalons également qu'aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) ne permet de discriminer les femelles intoxiquées par 10 et 100 µg/l d'atrazine.

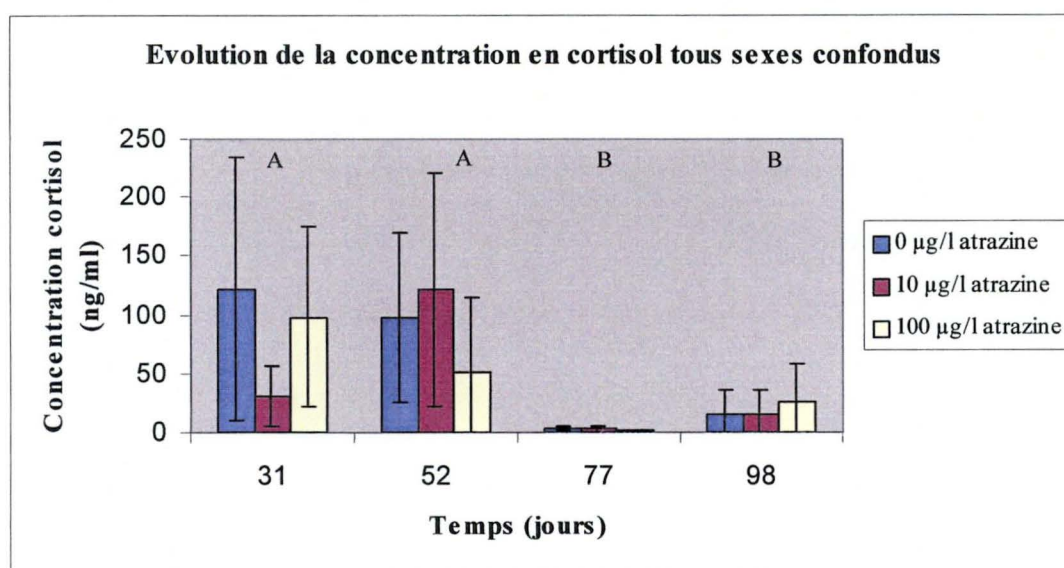
### 4.3. Le cortisol

L'évolution de la concentration en cortisol a été évaluée globalement pour chacun des trois traitements tout au long des 98 jours de l'expérimentation. Un manque de données relatives aux femelles pour notre dernier prélèvement nous a limité à une investigation portant sur les sur les trois premiers prélèvements.

Globalement, on peut observer des niveaux moyens élevés en cortisol chez les individus prélevés après 31 et 52 jours d'expérimentation. On trouve en effet des valeurs moyennes variant entre  $30,90 \pm 25,14$  et  $121,77 \pm 112,06$  ng/ml de cortisol chez les poissons prélevés au



31<sup>ème</sup> jour et ce, tout traitement confondu. Après 52 jours, les niveaux en cortisol restent encore élevés et oscillent en moyenne autour de  $51,89 \pm 62,68$  et  $121,11 \pm 99,06$  ng/ml de cortisol. A la suite de cette période, les concentrations moyennes en cortisol chutent fortement pour atteindre, au 77<sup>ème</sup> jour d'expérimentation, des valeurs variant entre  $1,50 \pm 0,83$  et  $3,00 \pm 1,52$  ng/ml de cortisol pour l'ensemble des trois traitements. Lors du dernier prélèvement, les concentrations moyennes en cortisol s'élèvent légèrement pour atteindre des moyennes variant entre  $15,11 \pm 21,49$  et  $26,10 \pm 31,74$ . Signalons aussi que l'ensemble des moyennes calculées tout au long de l'expérience et pour les différents traitements présentent des écarts-types très élevés.

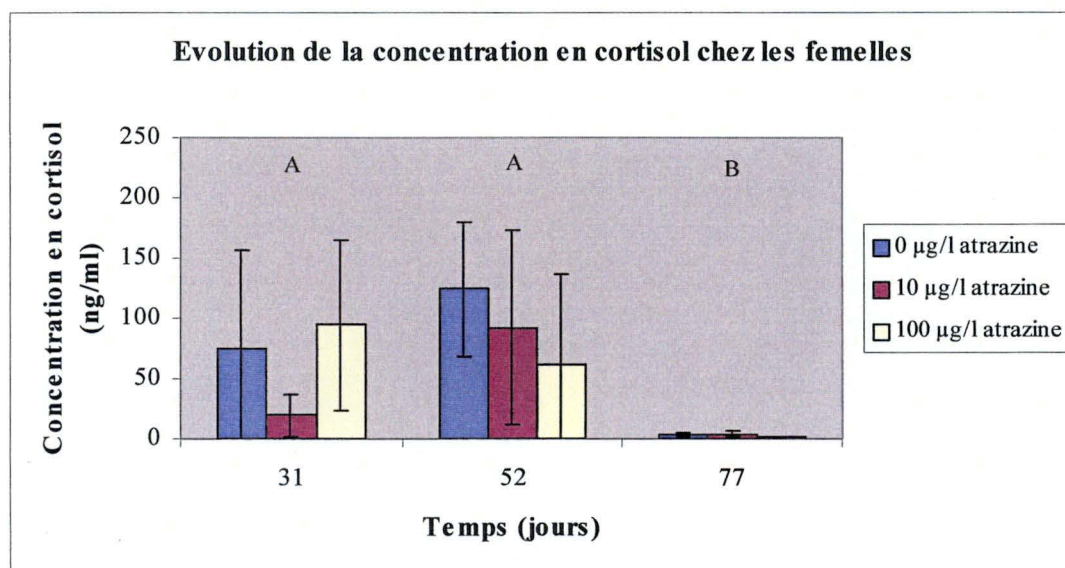


**Figure 3.9.** Evolution de la concentration en cortisol tous sexes confondus pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique par ANOVA2 (2 critères de classification croisés fixes) confirme que le temps influence de manière significative la concentration en cortisol chez l'ensemble des individus prélevés. Aucun effet de l'atrazine ne peut cependant être mis statistiquement en avant. Par contre, une interaction significative du temps et de la dose en atrazine peut être relevée. Un test d'égalité des moyennes portant sur le critère de la concentration en atrazine et du temps ne nous montre cependant aucune différence significative entre les différents lots de données, exception faite pour le contrôle du premier prélèvement et le groupe contaminé par 10 µg/l d'atrazine du troisième prélèvement.

Le traitement individuel des données relatives aux femelles nous présente globalement la même information que celle susmentionnée. En effet, on peut observer après une période de 31 et 52 jours des concentrations moyennes en cortisol élevées variant entre  $19,27 \pm 17,80$  et  $94,85 \pm 70,94$  ng/ml pour le 31<sup>ème</sup> jour et, entre  $61,72 \pm 75,29$  et  $124,35 \pm 55,25$  ng/ml pour le 52<sup>ème</sup> jour. Cette période est, à son tour, suivie d'une diminution importante de la

concentration moyenne en cortisol pour le 77<sup>ème</sup> jour d'expérimentation. En effet, les moyennes observées pour cette date se situent entre  $3,15 \pm 1,54$  et  $4,15 \pm 3,27$  ng/ml de cortisol. De nouveaux, de très grands écarts-types sont mis en évidence pour l'ensemble des lots de données.



**figure 3.10.** Evolution de la concentration en cortisol chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

L'analyse statistique par ANOVA2 (2 critères de classification croisés fixes) nous confirme l'influence significative du temps sur la concentration en cortisol et nous montre également qu'il n'existe aucun effet significatif de la dose ni aucune interaction entre les deux critères. Le test d'égalité des moyennes se basant sur le critère du temps nous signale que les moyennes obtenues pour le 77<sup>ème</sup> jour d'expérimentation sont bien significativement différentes de celles rencontrées pour les deux premiers prélèvements.

## 5. Les indicateurs immunitaires

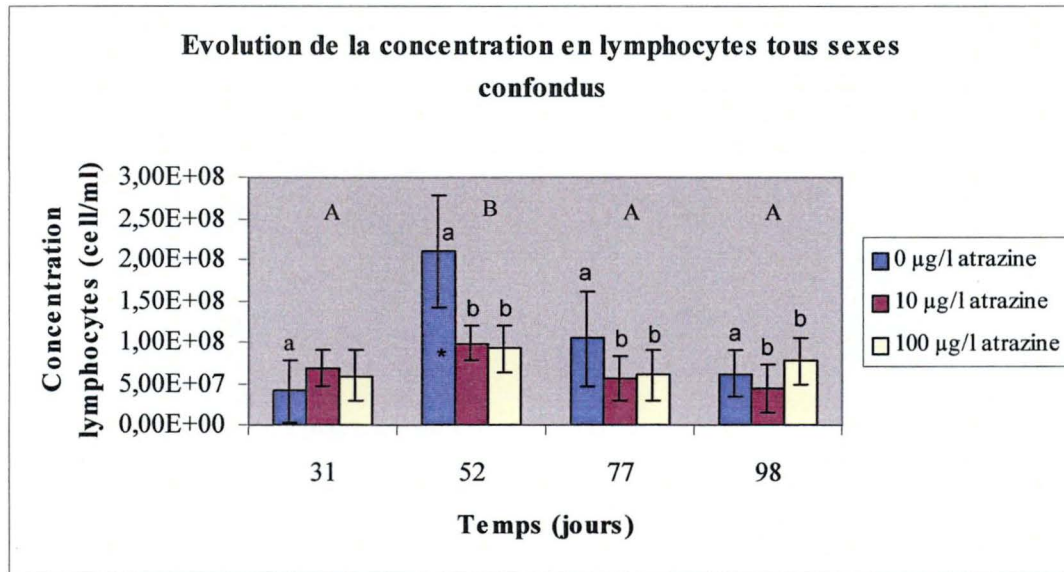
### 5.1. Les lymphocytes

Le comptage des lymphocytes a été effectué pour l'ensemble des trois traitements et sur l'ensemble des dates de prélèvements.

Globalement, on observe lors du traitement commun des données que la concentration moyenne en lymphocytes dans le sang est assez élevée. Des valeurs oscillant entre  $4,075 \cdot 10^6 \pm 3,76 \cdot 10^6$  pour le contrôle du premier jour et  $2,08 \cdot 10^8 \pm 6,8 \cdot 10^6$  pour le groupe contrôle

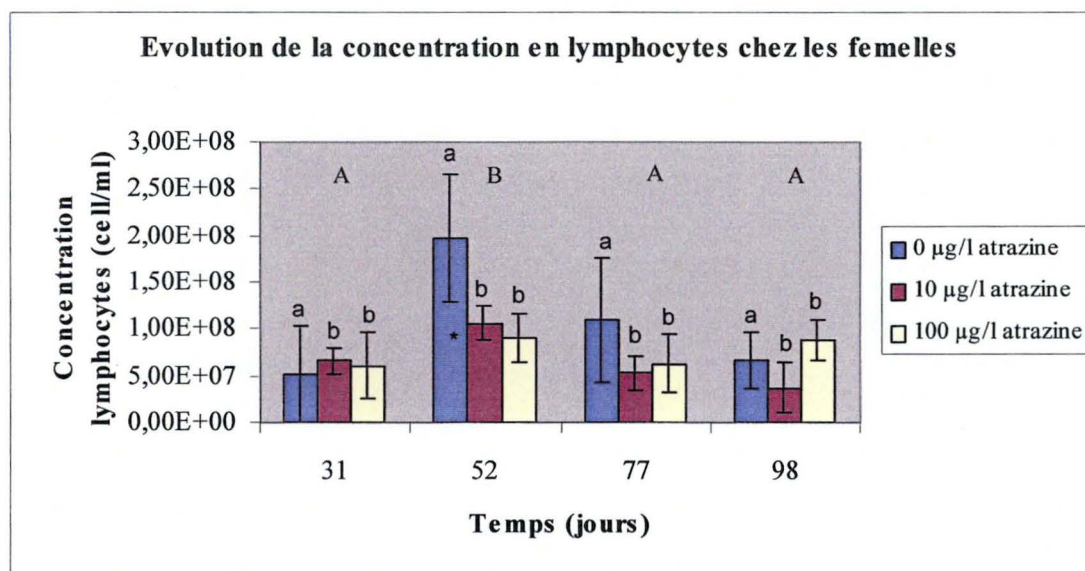


du 52<sup>ème</sup> jour d'expérimentation peuvent être observées. Il semble cependant que ce dernier présente une valeur anarchique beaucoup plus élevée que toutes les autres.



**figure 3.11** . Evolution de la concentration en lymphocytes tous sexes confondus pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Les catégories partageant au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différentes pour le critère dose, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Le contrôle du 52<sup>ème</sup> jour est significativement différent des autres lots de données.

L'analyse des données par ANOVA2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre qu'il existe un effet significatif du temps et/ou de la dose sur l'évolution de la concentration en lymphocytes dans le sang. Le test d'égalité des moyennes montre quant à lui que le temps 52 est significativement différent des trois autres. Le groupe contrôle est quant à lui, significativement différent des deux groupes caractérisant les poissons contaminés par de l'atrazine. Mais seul le groupe contrôle du 52) jour d'expérimentation présente une différence significative par rapport à tout les autres. Nous supposons donc que cette valeur extrême serait à elle seule responsable des différents effets significatifs mis en évidence.



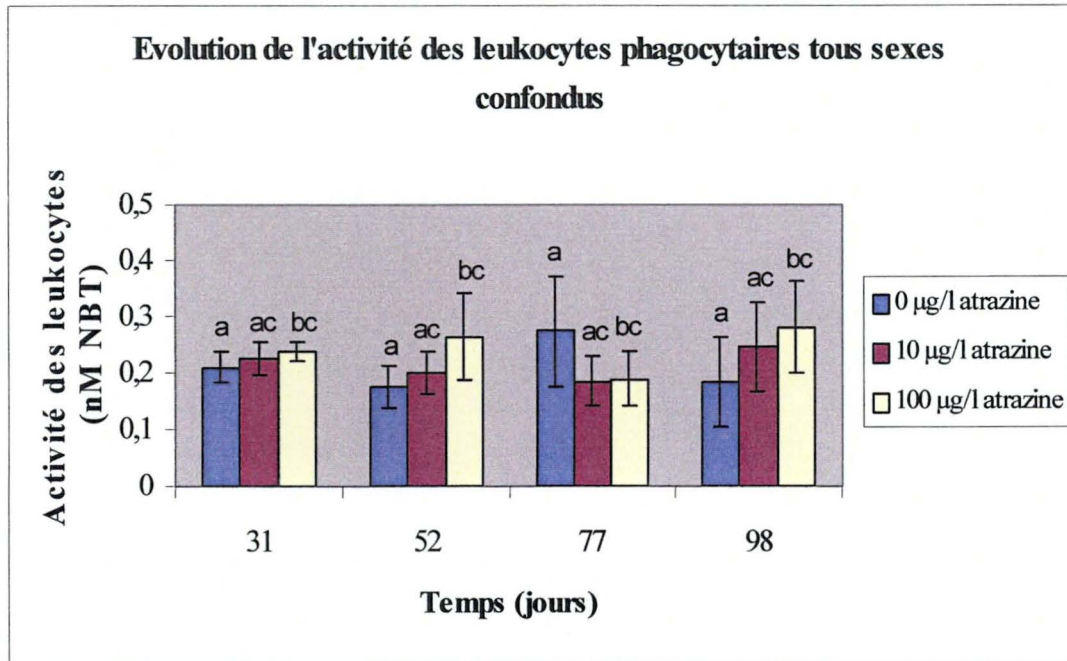
**figure 3.12.** Evolution de la concentration en lymphocytes chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (A,B) ne sont pas significativement différentes pour le critère temps, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Les catégories partageant au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différentes pour le critère dose, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ . Le contrôle du 52<sup>ème</sup> jour est significativement différent des autres lots de données.

## 5.2. L'activité des leukocytes phagocytaires

L'activité des leukocytes phagocytaires dans le sang a été caractérisée pour tous les traitements et à toutes les dates de prélèvements et ce, que ce soit dans le cadre de l'analyse globale ou de l'analyse ciblée exclusivement sur les femelles.

Globalement, on remarque que les poissons soumis à une contamination de 10 et 100 µg/l d'atrazine présentent une activité des leukocytes phagocytaires plus élevée par rapport aux poissons du groupe contrôle (figure 3.13). On trouve en effet des valeurs moyennes variant entre  $0,17 \pm 0,03$  et  $0,27 \pm 0,09$  nM NBT chez les poissons du contrôle alors que les valeurs obtenues pour les poissons intoxiqués par 100 µg/l d'atrazine atteignent des niveaux d'activité moyens de plus de 2 nM NBT et ce, pour chacune des dates de prélèvements.

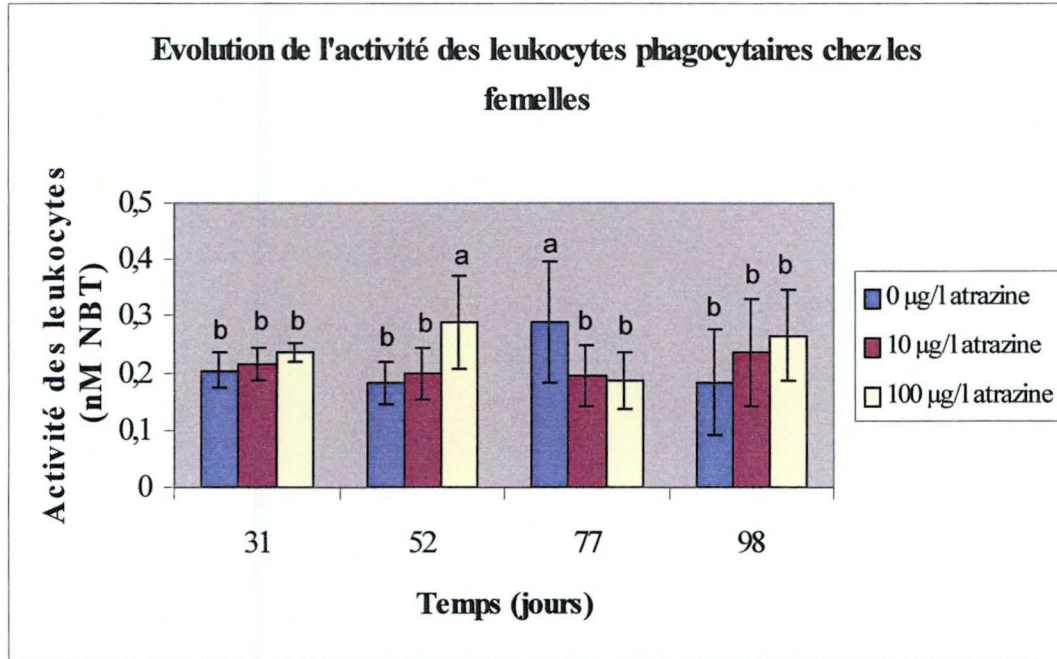




**Figure 3.13.** Evolution de l'activité des leukocytes phagocytaires tous sexes confondus pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (a,b,c) ne sont pas significativement différentes pour le critère dose, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

Le traitement statistique des données par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) confirme nos observations, à savoir que l'atrazine influence positivement et significativement l'activité des leukocytes phagocytaires. Cependant, le test d'égalité des moyennes nous montre que seuls les poissons soumis à 100 µg/l d'atrazine présentent des niveaux d'activité plus élevés. Signalons aussi qu'un effet significatif d'une interaction entre le temps et la dose est mis en évidence par l'ANOVA mais que le test de Scheffé ne montre aucune différence significative entre les différents jeux de données. Ceci voudrait simplement dire que l'effet de l'atrazine, bien qu'étant significatif, ne stimulerait que très légèrement l'activité des leukocytes phagocytaires.

L'analyse individuelle des données liées aux femelles tend à mettre en évidence les mêmes effets que ceux illustrés précédemment, à savoir une influence positive de la concentration de 100 µg/l d'atrazine sur l'activité des leukocytes phagocytaires (figure 3.14). Des valeurs moyennes oscillant entre  $0,18 \pm 0,04$  et  $0,29 \pm 0,08$  nM NBT sont effectivement trouvées pour cette concentration en toxique. Malheureusement, l'ANOVA 2 ne confirme pas l'effet significatif de l'atrazine. De plus, le test de Scheffé servant à comparer l'ensemble des moyennes selon le critère de la dose en atrazine et du temps nous montre que seules deux valeurs sont significativement différentes de l'ensemble du jeu de données.



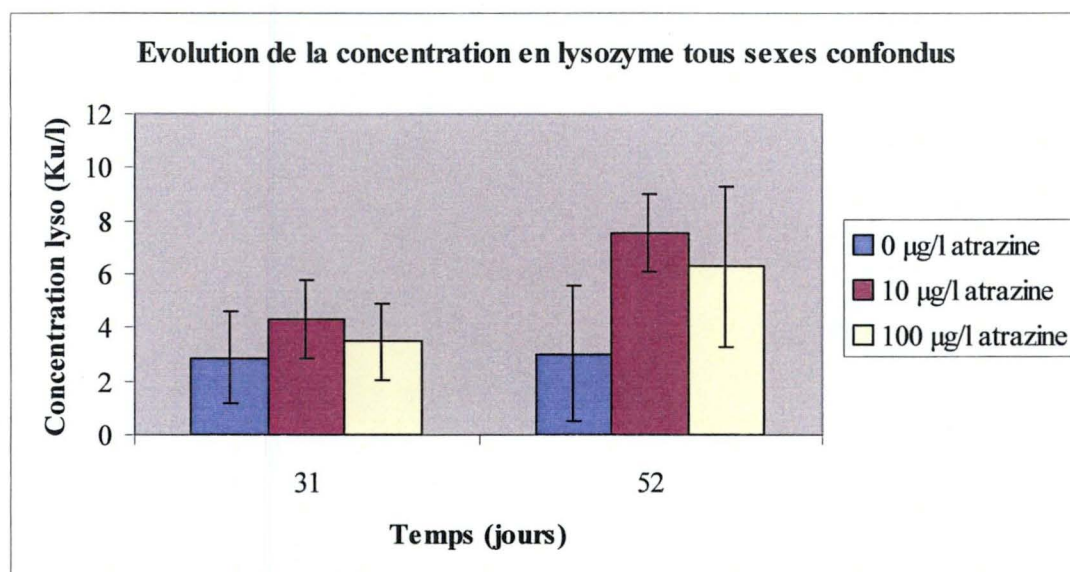
**Figure 3.14.** Evolution de l'activité des leukocytes phagocytaires chez les femelles pendant les 98 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  les écarts-types. Les catégories partageant au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différentes pour les critères temps et doses, alors que les autres comparaisons diffèrent à  $p < 0,05$ .

### 5.3. Le lysozyme

Dans un premier temps, nous voudrions signaler au lecteur que des difficultés importantes ont été rencontrées lors de la mise au point du dosage du lysozyme sur le plasma du carassin doré. De ce fait, une fois les difficultés surmontées, il nous restait trop peu de matériel biologique pour effectuer la totalité des dosages. Nous nous sommes donc limités à une investigation générale portant sur les échantillons collectés après 31 et 52 jours d'expérimentation.

Globalement, il semblerait que les concentrations en lysozyme soient plus élevées pour les poissons contaminés par 10 et 100 µg/l d'atrazine que pour le groupe contrôle (figure 3.15). Des valeurs avoisinant les  $7,57 \pm 1,47$  et  $6,31 \pm 3,01$  Ku/l sont mises en évidence pour ces deux concentrations en toxique après 52 jours d'expérimentation. A la même période, la concentration moyenne en lysozyme dans le groupe contrôle varie entre  $3,03 \pm 2,54$  Ku/l. De plus, les valeurs moyennes mises en évidence après 52 jours sont très légèrement supérieures à celles obtenues lors du premier prélèvement.





**Figure 3.15.** Evolution de la concentration en lysozyme tous sexes confondus pendant les 52 premiers d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écarts-types.

L'analyse statistique par ANOVA 2 (2 critères de classification croisés fixes) nous montre cependant qu'il n'existe aucun effet significatif de la concentration en atrazine et/ou du temps sur les niveaux en lysozyme mesurés. Il nous paraît cependant peu opportun, à la vue du nombre de données analysées, de prendre ce résultat statistique en considération. En effet, un effet significatif à long terme de l'atrazine aurait peut-être été mis en évidence si l'ensemble des concentrations en lysozyme avaient pu être mesurées.

Quatrième partie

## **Discussion**



## Discussion

La discussion qui suit se présente en trois parties distinctes, traitant respectivement de l'influence de l'atrazine sur le système de reproduction des juvéniles du carassin doré, sur la caractérisation d'un effet de stress induit par le toxique et, pour finir, sur une éventuelle modulation du système immunitaire engendrée par l'atrazine.

### 1. Influence de l'atrazine sur la reproduction du carassin doré

L'un des premiers objectifs de ce mémoire était de mettre en évidence une action délétère éventuelle de l'atrazine en contamination chronique sur la stéroïdogénèse ovarienne et testiculaire ainsi que sur le développement des gonades.

Au terme de nos investigations, cet objectif n'est malheureusement pas atteint pour les mâles mais l'est partiellement pour les femelles. En effet, un problème de sex-ratio ne nous a pas permis de traiter les données relatives aux mâles. Dès lors, nous ne pouvons apporter au lecteur quelque information concernant cet aspect de la problématique étudiée.

En ce qui concerne les femelles, une autre forme de difficulté a été rencontrée. En effet, ni les femelles servant de contrôle ni celles intoxiquées par 10 et 100 µg/l d'atrazine ne semblent globalement avoir terminé leur maturation. Les valeurs obtenues pour le calcul du RGS ne montrent aucune évolution temporelle significative dans le développement des gonades, alors que les juvéniles utilisés étaient en âge de première maturation et soumis à une photopériode qui, d'ordinaire, induit le développement des gonades, l'ovulation et la ponte. Comme illustré lors de la présentation de nos résultats, le RGS moyen des femelles contrôles est de  $0,92 \pm 0,39$  %. Des valeurs publiées par Bjerselius *et al.* (2001) rapportent un RGS de  $6,03 \pm 1,05$  % chez les femelles du carassin doré âgées de 2 ans. Ceci confirme que nos femelles n'ont pas atteint les stades finaux de maturation.

L'analyse histologique des gonades situe, en début d'expérience, le stade le plus représenté du développement ovocytaire au début de la vitellogenèse endogène. Après 98 jours d'expérimentation, on atteint, pour la majorité des femelles, la fin de la vitellogenèse endogène, voire le début de la vitellogenèse exogène.

Les valeurs relatives à la concentration plasmatique en oestradiol, qui est la principale hormone intervenant dans le processus de développement ovocytaire chez les femelles, nous confirment que les poissons étudiés n'ont pas atteint, dans la majorité, les niveaux hormonaux nécessaires pour atteindre une maturation ovocytaire complète. Globalement, les



concentrations en oestradiol ne dépassent pas le ng/ml. Ces niveaux en hormone correspondent, chez la brème bordelière *Blicca bjoerkna* Linnaeus (1758), à la fin de la vitellogenèse exogène (Rinchart *et al.*, 1997). De plus, une étude récente menée par Spano *et al* (2002) met en évidence des concentrations en oestradiol chez les femelles matures du carassin doré variant entre 2,4 et 10,8 ng/ml. Il nous semble cependant important de signaler qu'en fin de manipulation, les concentrations moyennes en oestradiol chez les femelles étaient statistiquement plus élevées et atteignaient un niveau comparable à celui induisant le début de la vitellogenèse exogène chez la brème bordelière, une autre espèce à pontes multiples et fractionnées.

Les niveaux en testostérone correspondent, eux aussi, aux différents stades de maturation mis en évidence au cours du temps. Globalement, les concentrations en testostérone mesurées chez l'ensemble des femelles ne dépassent pas 2ng/ml, ce qui s'accorde avec une valeur inférieure à 5ng/ml mise en évidence chez la brème bordelière en fin de vitellogenèse exogène (Rinchart *et al.*, 1997).

Les concentrations en 11-ketotestostérone, bien qu'évoluant à la hausse au cours du temps chez l'ensemble des femelles, ne dépassent pas les 3 ng/ml. Spano *et al* (2002) ont, quant à eux, mis en évidence chez des femelles du carassin doré matures et saines, des concentrations en 11-ketotestostérone pouvant atteindre 3,2 ng/ml. Les valeurs maximales observées lors de notre expérience s'accordent dès lors avec des valeurs contrôles présentes dans la littérature.

Nous supposons qu'un retard global dans le processus de maturation est à l'origine des résultats obtenus et qu'une durée expérimentale plus longue aurait peut-être permis à l'ensemble des femelles d'atteindre un état de maturation plus avancé. Le retard observé dans le processus de maturation peut partiellement s'expliquer par le fait que les poissons étaient depuis très longtemps en conditions expérimentales standard et qu'ils n'avaient probablement jamais été soumis à une stimulation photopériodique. De plus, dès le début de l'expérience, la stimulation photopériodique utilisée était réglée sur 16 heures de jour en alternance avec 8 heures de nuit et ce, de façon constante. Il aurait peut-être mieux valu utiliser une photopériode croissante caractérisant de façon plus proche les conditions lumineuses naturelles. Le substrat de ponte étant absent, il est possible que ce dernier facteur n'ait pas amélioré les conditions expérimentales dans lesquelles nos poissons étaient placés. A l'avenir, il serait judicieux de réaliser ce type d'expérience dans des conditions de stabulation aussi proches que possibles des conditions optimales de maturation, à savoir une photopériode croissante, la présence de végétation, connue pour stimuler la maturation des femelles de carassins dorés, et des poissons placés en conditions photothermiques proches de celles du milieu naturel depuis leur jeune âge.

Au terme de cette première partie de discussion, nous pouvons avancer que la contamination des femelles juvéniles du carassin doré par l'atrazine à doses subléthales n'influence probablement pas la stéroïdogénèse ovarienne ni le développement des ovocytes. Nous ne



pouvons cependant pas affirmer que le toxique ne présente aucun effet délétère sur le système reproducteur des femelles. En effet, les stades de fin de maturation n'ayant pas été atteints par l'ensemble des individus étudiés, y compris les contrôles, il nous est difficile de prévoir quels auraient pu être les effets de l'atrazine sur une période de contamination plus longue, et donc, sur des femelles ayant subi une intoxication chronique pendant l'ensemble de leur cycle de développement ovocytaire.

## 2. Influence de l'atrazine sur les paramètres inhérents au stress

Le deuxième objectif que nous nous étions fixés était de caractériser un éventuel stress physiologique induit par une contamination chronique à l'atrazine. En effet, il a été illustré précédemment que les toxiques ont la possibilité d'induire un stress physiologique notamment en induisant une sécrétion en cortisol par l'interrénale. De même, une perturbation de l'équilibre ionique résultant d'une altération de l'osmorégulation peut être engendrée lors d'une contamination par des xénobiotiques.

Les résultats obtenus quant à l'impact de l'atrazine sur l'osmorégulation nous semblent intéressants. En effet, ceux-ci tendent à indiquer que l'atrazine induirait une perturbation à long terme de l'équilibre osmotique. Prasad et Reddy (1993) ont d'ailleurs montré qu'une contamination chronique à raison d'une concentration de 1mg/l d'atrazine pendant 90 jours induit, chez le tilapia du Mozambique, une augmentation de la concentration plasmatique en ions sodium et potassium. Il est donc possible, malgré les faibles doses en atrazine utilisées lors de notre expérience, que les effets observés soient dus à une augmentation progressive de l'activité de la Na-K ATPase. Ceci serait cependant en contradiction avec l'étude menée par Hanke *et al* en 1982 qui met en évidence, chez la carpe commune, un effet inhibiteur de l'atrazine sur l'activité de la Na-K ATPase.

Une autre hypothèse serait que des lésions engendrées au niveau des reins pourraient induire une diminution de l'excrétion et, par voie de fait, une augmentation de la concentration en ions dans le plasma. Les travaux de Oulmi *et al* (1995) ont d'ailleurs montré qu'une contamination chronique en atrazine pouvait induire chez la truite arc-en-ciel de nombreux dommages aux niveaux des tubes contournés distaux et proximaux. Pour finir, on pourrait imaginer que l'atrazine serait apte à induire une augmentation progressive de la sécrétion en prolactine par l'interrénale. En effet, une étude décrite par Eckert *et al* (2001) montre que la prolactine augmente l'apport en ions au niveau des branchies et que cette fonction serait notamment importante chez les poissons d'eau douce.

Un des effets les mieux connus en écotoxicologie est l'activation de la sécrétion de cortisol par les glandes surrénales. Ce glucocorticoïde est principalement sécrété lorsque des individus sont soumis à un stress. Un des modes d'action du cortisol consiste à induire la dépolymérisation du glycogène stocké dans les muscles afin de produire du glucose. Le



glucose sert ensuite de source énergétique et permet de contrecarrer l'augmentation de la dépense énergétique liée notamment à la détoxification. Dans le cadre de notre expérience, l'atrazine ne semble posséder aucun effet sur la sécrétion du cortisol et l'évolution du taux de glucose. Les concentrations moyennes en cortisol sont cependant élevées après un mois et demi d'expérimentation et dépassent, dans la majorité des cas, la valeur de 30 ng/ml citée par Gluth et Hanke (1985) comme étant la concentration normale en cortisol chez la carpe commune. Nous pensons cependant qu'il faut rester prudent face à cette analyse. En effet, à la vue de l'importance des écarts-types, il semblerait que l'augmentation en cortisol ne soit pas généralisée mais dépendante de certains individus probablement plus stressés que d'autres. Il est d'ailleurs reconnu qu'il existe une variabilité interindividuelle très importante chez les poissons face à la réponse fournie en condition de stress. De plus, il est probable qu'un stress expérimental lors de la manipulation des poissons soit à l'origine de cette augmentation disproportionnée en cortisol. Une autre hypothèse serait que le stress osmotique probablement engendré par l'atrazine soit à l'origine de l'augmentation en cortisol. Mais, étant donné qu'aucune action de l'atrazine ne peut être démontrée statistiquement, et que les poissons du contrôle présentent des niveaux moyens en cortisol aussi élevés que ceux mesurés chez les individus intoxiqués, nous préférons écarter cette hypothèse.

Un argument pouvant appuyer l'hypothèse du stress expérimental serait le profil de l'évolution en glucose observé au cours de l'expérimentation. En effet, si un facteur de stress est capable d'induire une production élevée en cortisol à long terme, il doit aussi induire une augmentation de la concentration en glucose. Or, si on compare le profil de l'évolution des concentrations en glucose et celui de l'évolution de la concentration en cortisol, l'effet inverse est obtenu. En effet, des concentrations moyennes en glucose relativement faibles sont mises en corrélation avec des niveaux moyens en cortisol très élevés.

Au terme de cette deuxième partie de discussion, nous pouvons suggérer que la contamination chronique des juvéniles du carassin doré par l'atrazine n'influence que très peu les paramètres caractérisant le stress, exception faite pour l'osmorégulation. Il nous paraît aussi important de signaler que les profils en cortisol observés sont probablement le fruit d'un stress expérimental. De ce fait, nous sommes dans l'incapacité d'avancer que l'atrazine n'induit pas une induction ou une répression à long terme sur la synthèse du cortisol. Etant donné le lien étroit existant entre la concentration en glucose plasmatique et le cortisol, nous sommes de nouveau dans l'incapacité d'avancer que l'atrazine ne possède aucun effet significatif sur l'évolution de la concentration en glucose chez les juvéniles intoxiqués.

### 3. Influence de l'atrazine sur le système immunitaire du carassin doré

Le troisième objectif de notre mémoire était de mettre en évidence une éventuelle modulation du système immunitaire spécifique et non-spécifique par l'atrazine et de voir si des différences entre les mâles et les femelles pouvaient être mises en évidence. L'influence de



l'atrazine sur les paramètres immunitaires non-spécifiques a pu être quantifiée, mais l'immunité spécifique n'a fait l'objet que de mises aux points protocolaires ouvrant cependant de belles perspectives de recherches. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure, à la vue du manque de données relatives aux mâles, de fournir une information quant à une différence potentielle entre les mâles et les femelles en ce qui concerne la réponse du système immunitaire non-spécifique à l'atrazine.

Les données lymphocytaires nous semblent devoir être prises avec précaution. En effet, bien que présentant des valeurs plus élevées, il semblerait que les contrôles ne présentent pas des concentrations en lymphocytes plus importantes que celles mises en évidence dans les autres groupes. Seule une valeur sur l'ensemble de l'échantillon semble être à l'origine des différents résultats statistiques obtenus. Il est probable que l'augmentation de la concentration en lymphocytes dans le groupe des contrôles soit due à une réponse immunitaire spécifique dirigée contre le pathogène ayant infesté les bassins pendant les 30 premiers jours de l'expérience. Le pathogène était également présent dans les autres bassins mais ceux-ci ont présenté une mortalité plus faible que celle rencontrée dans le bassin ne contenant pas d'atrazine. En conséquence, bien qu'étant soumis à la même souche bactérienne, il nous semble que le manque de standardisation rencontré entre les trois bassins pourrait être un argument faisant pencher pour une interprétation très prudente de nos résultats.

En ce qui concerne le lysozyme, aucune information probante ne peut-être avancée. En effet, l'absence de données pour les 77<sup>ème</sup> et 98<sup>ème</sup> jour d'expérimentation ne nous permet pas d'avancer que l'atrazine ne possède aucun effet délétère sur ce paramètre. De plus, le peu d'information concernant l'impact de l'atrazine sur l'immunité non-spécifique ne nous permet d'avancer une quelconque hypothèse sur ce qu'aurait pu donner un effet de l'atrazine à plus long terme.

L'action de l'atrazine sur la production des leukocytes phagocytaires semble quant à elle, plus marquée. En effet, bien qu'étant peu importante, une production plus élevée en radicaux superoxydes se remarque chez les poissons intoxiqués par 100 µg/l d'atrazine. Lorsque les données femelles sont traitées séparément on remarque que le test statistique ne nous donne plus la même information. Ceci tendrait à prouver que bien qu'étant significatives, les différences en production de radicaux superoxydes chez les individus intoxiqués sont très faibles. De plus, les données littéraires relatives à l'action des polluants sur l'explosion respiratoire manquent et ne nous permettent pas de confirmer ou d'infirmer que l'atrazine à dose sub-léthale chez les juvéniles du carassin doré influence positivement la production des radicaux superoxydes par les leukocytes phagocytaires.

Au terme de cette dernière partie de discussion, il nous semble que trop peu d'information quant à la problématique étudiée ont été récoltées. De ce fait, il nous est difficile d'avancer une information claire quant à l'action de l'atrazine sur le système immunitaire non-spécifique.



Cinquième partie

## **Conclusions et perspectives**



## Conclusions et perspectives

En ce qui concerne l'impact de l'atrazine à doses subléthales sur les juvéniles du carassin doré, *Carassius auratus auratus*, notre principale conclusion est que nos conditions expérimentales ne nous permettent pas d'établir un éventuel effet délétère de ce polluant sur la stéroïdogenèse et le développement ovarien. Cependant, les femelles étudiées n'ayant pas atteint le stade de maturation final escompté, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure définitivement en une absence d'effet de l'atrazine. De plus, ayant été dans l'incapacité de traiter les données inhérentes aux mâles, là encore nous ne pouvons rien conclure. Une de nos perspectives serait de pouvoir recommencer un même schéma expérimental en connaissant dès le départ le sexe des différents individus intoxiqués. Pour ce faire, diverses possibilités s'offrent à nous. L'une d'elles serait d'utiliser une espèce au dimorphisme sexuel marqué dès le stade juvénile. En complément, un marquage par *Pit Tags* nous permettra une reconnaissance individuelle des différents poissons et un suivi au cours du temps.

Concernant les indicateurs de stress, là encore nous n'avons pu mettre en évidence qu'un impact limité de l'atrazine. En effet, ni les concentrations plasmatiques en cortisol, ni celles en glucose ne sont affectées. Seule l'osmolarité sanguine présente une augmentation significative. Afin de déterminer les mécanismes d'action de l'atrazine sur cette fonction, une étude portant sur l'activité de la Na/K-ATPase au niveau des branchies pourrait se révéler prépondérante. De même, un dosage de concentrations ioniques tels que le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Cl}^-$  dans le plasma pourrait nous apporter des informations supplémentaires. Enfin, un effet indirect de l'atrazine via la sécrétion d'hormones impliquées dans l'osmorégulation telle que la prolactine, n'est pas à exclure et mériterait d'être étudié.

En ce qui concerne l'impact de l'atrazine sur le système immunitaire non spécifique, nous n'avons mis en évidence qu'une légère augmentation de la production des ions superoxydes par les leukocytes phagocytaires. Afin de vérifier s'il y a un réel effet de l'atrazine sur l'explosion oxydative, une stimulation par contamination bactérienne mettant le système immunitaire à l'épreuve pourrait se révéler être un schéma expérimental intéressant. Nous pourrions de plus caractériser un éventuel effet sur la synthèse d'anticorps.

Beaucoup de xénobiotiques que l'on retrouve actuellement dans la nature ont des effets sur le système reproducteur d'organismes aquatiques. Ces perturbateurs endocriniens sont au cœur de nombreux programmes de recherches actuels. En effet, les enjeux à terme sont grands. Plusieurs espèces de poissons pourraient ainsi voir leurs populations décroître dangereusement. De même, l'homme pourrait se retrouver confronté aux mêmes problèmes lorsqu'il est en contact avec de telles substances. Notre travail s'inscrit parfaitement dans

cette optique et apporte des données supplémentaires quant aux possibles effets en tant que perturbateur endocrinien d'un herbicide courant : l'atrazine. Les résultats obtenus, aussi modestes soient-ils, peuvent être considérés comme le point de départ d'une recherche plus large, permettant à terme d'apporter les connaissances nécessaires afin de prendre les bonnes décisions concernant l'utilisation de ces substances.



## **Bibliographie**



## Bibliographie

- AKKANEN, J., PENTINEN, S., HAITZER, M., KUKKONRN, J.V.K. (2001). Bioavaibility of atrazine, pyrene and benzo[a]pyrene in European river waters. *Chemosphere* **45**, 453–462.
- ARORA, N., KULSHRESTHA, S.K. (1984). Comparison of the toxic effects of two pesticides on the testes of a freshwater teleost, *Channa striatus* Bl. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **12**, 435-441.
- ARUKWE, A. (2001). Cellular and molecular responses to endocrine modulators and the impact on fish reproduction. *Mar. Poll. Bull.* **42** (8),643–655.
- BAGCHI, P., CHATTERJEE, S., RAY, A., DEB, C. (1990). Effect of quinalphos, organophosphorus insecticide, on testicular steroidogenesis in fish, *Clarias batrachus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **44**, 871-875.
- BATTY, J., LIM, R. (1999). Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 301-307.
- BERCZI, I, NAGI, E. (1998). In: THOMAS, E., KRESINA, F. (Eds.). Immune modulating agents. *Marcel Dekker Inc., New York*, pp. 75-120.
- BERGERON, J.M., CREWS, D., McLACHLAN, J.A. (1994). PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health. Perspect.* **102**, 780-781.
- BHATTACHARYA, L., PANDEY, A.K. (1989). Inhibition of steroidogenesis and pattern of recovery in the testes of DDT exposed cichlid – *Oreochromis mossambicus*. *Bangladesh. J. Zool.* **17**, 1-14.
- BJERSELIUS, R., LUNDSTEDT-ENKEL, K., OLSEN, H., MAYER, I., DIMBERG, K. (2001). Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17  $\beta$ -estradiol. *Aquat. Toxicol.* **53**, 139-152.
- BOLS, N.C., BRUBACHER, J.L., GANASSIN, R.C., LEE, L.E.J. (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Development and Comparative Immunology* **25**, 853-873.
- BORDAS, M.A., BALEBONA, M.C., ZORRILLA, I., BORREGO, J.J., MORINIGO, M.A. (1996). Kinetcs of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3650-3654.
- BORTONE, S.A., DAVIS, W.P. (1994). Fish intersexuality as indicator of environmental stress. Monitoring fish reproductive systems can serve to alert humans to potential harm. *Bioscience* **44**, 165-172.
- BOWERS, A., ALEXANDER, J.G. (1981). Hyperosmotic infiltration: immunological demonstration of infiltrating bacteria in brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish. Biol.* **18**, 9-13.



- BRAUNBECK, T. (1994). Detection of environmentally relevant concentrations of toxic organic compounds using histological parameters: substance specificity in the reaction of rainbow trout liver?
- CHAKRAVORTY, S., LAL, B., SINGH, T.P. (1992). Effect of endosulfan (Thiodan) on vitellogenesis and its modulation by different hormones in the vitellogenic catfish, *Clarias batrachus*. *Toxicol.* **75**, 191-198.
- CHENG, S.K., RUBY, S.M. (1981). Effects of pulse exposure to sublethal levels of hydrogen cyanide on reproduction of American flagfish, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **10**, 105-116.
- CHEVREUIL, M., GARMOUMA, M., CHESSTERIKOFF, A. (1996). Occurrence of organochlorine (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of Paris area. *Sci. Total. Environm.* **182** (1-3), 25-37.
- CHOUDHURY, C., RAY, A.K., BHATTACHARYA, S., BHATTACHARYA, S. (1993). Non-lethal concentrations of pesticide impair ovarian function in the freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Environ. Biol. Fish.* **36**, 319-324.
- CLELAND, G.B., SONSTEGARD, R.A. (1987). Natural killer cell activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): effect of dietary exposure to aroclor 1254 and/or mirex. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **44**, 636-638.
- COLLIER, T.K., JOHNSON, L.L., STEHR, C.M., MYERS, M.S., STEIN, J.E. (1998). A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway. *Mar. Environ. Res.* **46**, 243-247.
- COOK, J. (1994). The effects of stress, background colour and steroid hormones on the lymphocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ph.D. Thesis, University of Sheffield*.
- COOKE, P.S., ZHAO, Y., HANSEN, L.G. (1996). Neonatal polychlorinated biphenyl treatment increases adult testis size and sperm production in the rat. *Tox. And Appl. Pharmac.* **136**, 112-117.
- COPE, O.B., WOOD, E.M., WALLEN, G.H. (1970). Some chronic effects of 2,4-D on the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Trans. Am. Fish. Soc.* **99**, 1-12.
- CRAIN, D.A. (1997). Endocrine disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in toxicology. Environmental toxicology. IOS press.* 47-70.
- CRAIN, D.A., GUILLETTE, L.J.Jr (1997). Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in Toxicology* **1**, 47-70.
- CRAIN, D.A., SPITERI, I.D., GUILLETTE, L.J. (1999). The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed in ovo to atrazine, 2,4-D or estradiol. *Toxicology and Industrial Health* **15** (1-2), 180-185.
- DAVIS, W.P., BORTONE, S.A. (1992). Effects of kraft mill effluents on the sexuality of fishes: an environmental early warning. In *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connections*, eds. T. Colborn and C. Clement, Vol. XXI, pp. 113-127.



- DONATI, L., FUNARI, E. (1993). Review of leaching characteristics of triazines and their degradation products. *Ann. Ist. Sanita'*. **29** (2), 225-241.
- ECKERT, S.M., YADA, T., SHEPHERD, B.S., STETSON, M.H., HIRANO, T., GRAU, E.G. (2001). Hormonal control of osmoregulation in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 122, **3**, 270-286.
- ELLGEHAUSEN, H., GUTH, J.A., ESSER, H.O. (1980). Factors affecting the bioaccumulation potential of pesticides in the individual compartments of aquatic foodchains. *Ecotocal. Environ. Saf.* **4** (2), 134-157.
- ELSASSER, M.S., ROBERSON, B.S., HETRICK, F.M. (1986). Effects of metals on the chemiluminescent response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**, 243-250.
- ENANE, N.A., FRENKEL, K., O'CONNOR, J.M., SQUIBB, K.S., ZELIKOFF, J.T. (1993). Biological markers of macrophage activation: Application for fish phagocytes. *Immunology* **80**, 63-72.
- EVANS, D.L., JASO-FRIEDMANN, L. (1992). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 109-121.
- EVELYN, T.P. (1996). Infection and disease. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. editors. The fish immune system. *Fish Physiology series vol. 15 San Diego, CA: Academic Press*, pp. 339-366.
- FAISAL, M., WEEKS, B.A., VOGELBEIN, W.K., HUGGETT, R.J. (1991). Evidence of aberration of the natural cytotoxic cell activity in *Fundulus heteroclitus* (Pisces: Cyprinodontidae) from Elizabeth River, Virginia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **29**, 339-351.
- FOSTIER, A., JALABERT, B. (1986). Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and *in vivo* and *in vitro* responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry.* **2**, 87-99.
- FOURNIER, M., LACROIX, A., VOCCIA, I., BROUSSEAU, P. (1998). Phagocytic and metabolic activities of macrophages from mummichog naturally exposed to pulp mill effluents in the Miramichi river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **40**, 177-183.
- FREEMAN, H.C., SANGALANG, G. (1977). Changes in steroid hormone metabolism as a sensitive method of monitoring pollutants and contaminants. *Proc. 3<sup>rd</sup>. Aquat. Toxicity Workshop, Halifax, NS, Nov. 1976, Environ. Prot. Service Techn. Rep. No. EPS-5-77-1, Halifax, Canada*, pp. 123-132.
- GIMENO, S., KOMEN, H., GERRITSEN, A.G.M., BOWMER, T. (1998a). Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.* **43**, 77-92.
- GIMENO, S., KOMEN, H., JOBLING, S., SUMPTER, J., BOWMER, T. (1998b). Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.* **43**, 93-109.



GLUTH, G., FREITAG, D., HANKE, W., KORTE, F. (1985). Accumulation of pollutants in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **81C** (2), 273–277.

GLUTH, G., HANKE, W. (1985). A comparison of physiological changes in carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentrations. I. The dependency on exposure time. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **9**, 179–188.

GOODMAN, L.R., HANSEN, D.J., MANNING, C.S., FAAS, L.F. (1982). Effects of Kepone on the sheepshead minnow in an entire life-cycle toxicity test. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **11**, 335–342.

GRAYMORE, M., STAGNITI, F., ALLINSON, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environnement international* **26**, 483–495.

HAIDER, S., INBARAJ, R.M. (1988). *In vitro* effect of malathion and endosulfan on the LH-induced oocyte maturation in the common carp, *Cyprinus carpio* (L.). *Water, Air Soil Poll.* **39**, 27–31.

HAIDER, S., UPADHYAYA, N. (1985). Effect of commercial formulation of four organophosphorus insecticides on the ovaries of a freshwater teleost, *Mystus vittatus* (Bloch) – A histological and histochemical study. *J. Environ. Sci. Health* **B20**, 321–340.

HAIDER, S., UPADHYAYA, N. (1986). Effect of commercial formulation of four organophosphorus insecticides on the LH-induced germinal vesicle breakdown in the oocytes of a freshwater teleost, *Mystus vittatus* (Bloch) – a preliminary *in vitro* study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **12**, 161–165.

HANKE, W., GLUTH, G., BUBEL, H., MÜLLER, R. (1983). Physiological changes in carps induced by pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **7**, 229–241.

HARRIES, J.E., SHEAHAN, D.A., JOBLING, S., MATTHIESSEN, P., NEALL, P., SUMPTER, J.P., TYLOR, T., ZAMAN, N. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 534–542.

HARRIS, J., BIRD, D.J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **77**, 163–176.

HEWITT, L.M., PARROTT, J., WELLS, K., CALP, M.K., BIDDISCOMBE, S., McMASTER, M., MUNKITTRICK, K., VAN DER KRAAK, G. (2000). Characteristics of ligands for the Ah receptor and sex steroid receptors in hepatic tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4327–4334.

HINTON, D.E. (1997). Histological responses signifying exposure or effect and their application to aquatic ecotoxicology. In: *Ecotoxicology: Responses, biomarkers and risk assessment*. OECD workshop (J. T. ZELIKOFF, ed) SOS publications. Fair haven. NJ. USA.

HOLDWAY, D.A., DIXON, D.G. (1986). Impact of pulse exposure to methoxychlor on flagfish (*Jordanella floridae*) over one reproductive cycle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **43**, 1410–1415.



- HOWELL, W.M., DENTON, T.E. (1989) Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environ. Biol. Fish* **24**, 43-51.
- HUBER, W. (1993). Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**, 1865-1881.
- IARC (1999). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks hum. **73**, 59-99.
- IGER, Y., LOCK, R.A.C., VAN DER MEIJ, J.C.A., WENDELAAR BONGA, S.E. (1994). Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicology* **26**, 342-350.
- JANSSEN, P.A.H. (1996). Reproduction of the flounder, *Platichthys flesus* (L.), in relation to environmental pollution: Steroids and vitellogenesis. *Ph. D. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands*.
- JANSSEN, P.A.H., LAMBERT, J.G.D., GOOS, H.J.Th. (1995). The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*. *J. Fish Biol.* **47**, 509-523.
- JOBLING, S., SHEAHAN, D.A., OSBORNE, J.A., MATTHIESSEN, P., SUMPTER, J.P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 194-202.
- JOBLING, S., TYLER, C.R., NOLAN, M., SUMPTER, J.P. (1998b). The identification of oestrogenic effects in wild fish. *London: UK Environment Agency, R&D Technical Report W119*.
- JOHNSON, L.L., SOL, S.Y., YLITALO, G.M., HOM, T., FRENCH, B., OLSON, O.P., COLLIER, T.K. (1997). Precocious sexual maturation and other reproductive anomalies in English sole (*Pleuronectes vetulus*) from an urban waterway. *International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, ICES CM 1997/U:07*, 15 pp + figs.
- KHANGAROT, B.S., RATHORE, R.S., TRIPATHI, D.M. (1999). Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobramchus fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol. Env. Saf.* **43**, 11-20.
- KIME, D.E. (1987). The steroids. In: CHESTER-JONES, I., INGLETON, P., PHILLIPS, J.G. (Eds.). *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology*. Plenum Press, New York, pp. 3-56.
- KIME, D.E. (1995). The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in fish and fisheries* **5**, 52-96.
- KIME, D.E. (1998). Endocrine disruption in fish. *Kluwer Academic Publishers*. 396 p.
- KIME, D.E., NASH, J.P. (1999). Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. *The Science of the Total Environment*. **233**, 123-129.



- KULSHRESTHA, S.K., ARORA, N. (1984). Impairments induced by sublethal doses of two pesticides in the ovaries of a freshwater teleost, *Channa striatus* (Bloch). *Toxicol. Lett.* **20**, 93-98.
- KUMAR, S., PANT, S.C. (1988). Comparative sublethal ovarian pathology of some pesticides in the teleost, *Puntius conchoni* (Hamilton). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 227-232.
- KUMAR, V., MUKHERJEE, D. (1988). Phenol and sulfide induced changes in the ovary and liver of sexually maturing common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* **13**, 53-60.
- LARSSON, D.G.J., ADOLFSSON-ERICI, M., PARKKONEN, J., PETTERSSON, M., BERG, A.H., OLSSON, P.-E., FÖRLIN, L. (1999). Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* **45**, 91-97.
- LEMAIRE-GONY, S., LEMAIER, P., PULSFORD, A.L. (1995). Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* **31**, 297-313.
- MALLATT, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 630-648.
- MANI, K., SAXENA, P.K. (1985). Effect of safe concentrations of some pesticides on ovarian recrudescence in the freshwater murrel, *Channa punctatus* (Bl.): A quantitative study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **9**, 241-249.
- McMASTER, M.E., PORTT, C.B., MUNKITTRICK, K.R., DIXON, D.G. (1992). Milt characteristics, reproductive performance and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **23**, 103-117.
- McMASTER, M.E., VAN DER KRAAK, G.J., MUNKITTRICK, K.R. (1995). Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp. Biochem. Physiol.* **112C**, 169-178.
- McMASTER, M.E., VAN DER KRAAK, G.J., PORTT, C.B., MUNKITTRICK, K.R., SIBLEY, P.K., SMITH, I.R., DIXON, D.G. (1991). Changes in hepatic mixed-function oxidase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* **21**, 199-218.
- Ministère de la Région wallonne (2000). L'environnement wallon à l'aube du 21<sup>e</sup> siècle, approche évolutive. 420p, 103-108.
- MONOD, G., DE MONES, A., FOSTIER, A. (1993). Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* **35**, 147-152.
- MOORE, A., WARING, C.P. (1996). Sublethal effects of the pesticide Diazinon on olfactory function in mature male Atlantic salmon parr. *J. Fish Biol.* **48**, 758-775.
- MORTENSEN, R.F., ZHONG, W. (2000). Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 495-500.



- MUHVICH, A.G., JONES, R.T., KANE, A.S., ANDERSON, R.S., REIMSCHEUSSEL, R. (1995). Effects of chronic copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **5**, 251-264.
- MUNKITTRICK, K.R., DIXON, D.G. (1989). Effects of natural exposure to copper and zinc on egg size and larval copper tolerance in white sucker (*Catostomus commersoni*). *Ecotox. Environ. Saf.* **18**, 15-26.
- MUNKITTRICK, K.R., PORTT, C.B., VAN DER KRAAK, G.J., SMITH, I.R., ROKOSH, D.A. (1991). Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **48**, 1371-1380.
- NAGAE, M., FUDA, H., URA, K., KAWAMURA, H., ADACHI, S., HARA, A., YAMAUCHI, K. (1994). The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiol. Biochem.* **13**, 41-48.
- NAGAHAMA, Y., YOSHIKUNI, M., YAMASHITA, M., TANAKA, M. (1994). Regulation of oocyte maturation in fish, 393-439. In SHERWOOD, N.M. and HEW, C.L. (eds), *Fish Physiology, Molecular endocrinology of fish, Volume XIII, Academic Press, Inc.*, 518 p.
- NESKOVIC', N.K., ELEZOVIC', I., KARAN, V., POLEKSIC', V., BUDIMIR, M. (1993). Acute and subacute toxicity of atrazine to Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **25**, 173-182.
- NIMROD, A.C., BENSON, W.H. (1996). Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Mar. Environ. Res.* **42**, 155-160.
- ORDELMAN, H.G.K. *et al.*, (1993). Watersysteemverkenningen. Een analyse van de problematiek in aquatisch milieu. *RIZA. Nata.* 93. 036.
- OULMI, Y., NEGELE, R.D., BRAUNBECK, T. (1995). Specificity of the cytological response in Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) renal tubes following prolonged exposure to sublethal concentrations of atrazine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **32**, 39-50.
- PATINO, R., MAULE, A.G. (1997). Estrogen receptors in leukocytes from immature channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **21**, 123.
- PAUL, I., MANDAL, C., MANDAL, C. (1998). Effect of environmental pollutants on the C-reactive protein of a freshwater major carp, *Catla catla*. *Dev. Comp. Immunol.* **22**, 519-532.
- PICKERING, Q., BRUNGS, W., GAST, M. (1977). Effect of exposure time and copper concentration on reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Water Res.* **11**, 1079-1083.
- PRASAD, T.A.V., REDDY, D.C. (1994). Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish, *Tilapia mossambicus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **28**, 313-316.



- PULSFORD, A.L., LEMAIRE-GONY, S., TOMLINSON, M., COLLINGWOOD, N., GLYNN, P.J. (1994). Effects of acute stress on the immune system of the dab, *Limanda limanda*. *Comp. Biochem. Physiol.* **109 C**, 129-139.
- PUNDIR, R., SAXENA, A.B. (1990). Seasonal changes in the testes of fish *Puntius tico*, and their relation to heavy metal toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **45**, 288-293.
- PURDOM, C.E., HARDIMAN, P.A., BYE, V.J., ENO, N.C., TYLER, C.R., SUMPTER, J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**, 275-285.
- RAM, R.J., SATHYANESAN, A.G. (1987). Effect of a mercurial fungicide on the gonadal development of the teleostean fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **11**, 352-360.
- RAM, R.N., JOY, K.P. (1988). Mercurial induced changes in the hypothalamo-neurohypophysial complex in relation to reproduction in the teleostean fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 329-336.
- RICE, C.D., BANES, M.M., ARDELT, T.C. (1995). Immunotoxicity in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, following acute exposure to tributyltin. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **28**, 464-470.
- RICHMONDS, C., DUTTA, H.M. (1989). Histopathological changes induced by malathion in the gills of blue gill *Lepomis macrochirus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 123-130.
- RINCHARD, J., KESTEMONT, P., HEINE, R. (1997). Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations. *J. Fish Biol.* **50**, 169-180.
- ROMBOUT, J.H.W.M., TAVERNE, N., VANDEKAMP, M., TAVERNETHIELE, A.J. (1993). Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology* **17** (4), 309-317.
- ROUTLEDGE, E.J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G.C., WALDOCK, M., SUMPTER, J.P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1559-1565.
- RUBY, S.M., JAROSLAWSKI, P., HULL, R. (1993). Lead and cyanide toxicity in sexually maturing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.* **26**, 225-238.
- SAKAI, M., KOBOYASHI, M., KAWAUCHI, H. (1996). In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin, prolactin and somatolactin. *J. Endocrinol.* **151**, 113-118.
- SANCHEZ-DARDON, J., VOCCIA, I., HONTELA, A., CHILMONCZYK, S., DUNIER, M., BOERMANS, H., BLAKELY, B., FOURNIER, M. (1999). Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 1492-1497.
- SANDSTRÖM, O., NEUMAN, E., KARAS, P. (1988). Effects of a bleached pulp mill effluent on growth and gonad function in Baltic coastal fish. *Water. Sci. Tech.* **20**, 107-118.



- SANGALANG, G.B., O'HALLORAN, M.J. (1973). Adverse effects of cadmium on brook trout testis and on *in vitro* testicular androgen synthesis. *Biol. Reprod.* **9**, 394-403.
- SAXENA, P.K., MANI, K. (1987). Effect of safe concentrations of some pesticides on testicular recrudescence in the freshwater murrel, *Channa punctatus* (Bl.): a morphological study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **14**, 56-63.
- SEELEY, K.R., WEEKS-PERKINS, B.A. (1997). Suppression of natural cytotoxic cell and macrophage phagocytic function in oyster toadfish exposed to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Fish & Shellfish Immunol.* **7**, 115-121.
- SHARIFF, M., JAYAWARDENA, P.A.H.L., YUSOFF, F.M., SUBASINGHE, R. (2001). Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunol.* **11**, 281-291.
- SHEA, T.B., BERRY, E.S. (1984). Suppression of interferon synthesis by the pesticide carbaryl as a mechanism for enhancement of goldfish virus-2 replication. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 250-252.
- SHEPHARD, K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* **4**, 401-429.
- SHUKLA, J.P., PANDEY, K. (1984). Impaired spermatogenesis in arsenic treated freshwater fish, *Colisa fasciatus* (Bl. And Sch.). *Toxicol. Lett.* **21**, 191-195.
- SHUKLA, J.P., PANDEY, K. (1985). Ovarian recrudescence in a freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* in DDT treatment and pattern of recoupment. *J. Environ. Biol.* **6**, 195-204.
- SINGH, H. (1989). Interaction of xenobiotics with reproductive endocrine functions in a protogynous teleost, *Monopterus albus*. *Mar. Environ. Res.* **28**, 285-289.
- SINGH, H. (1993). Effects of malathion on steroidogenesis and sex reversal in *Monopterus albus*. *Mar. Environ. Res.* **35**, 159-164.
- SINGH, P.B., KIME, D.E. (1995). Impact of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane on the *in vitro* production of steroids from endogenous and exogenous precursors in the spermiating roach, *Rutilus rutilus*. *Aquat. Toxicol.* **31**, 231-240.
- SINGH, P.B., KIME, D.E., EPLER, P., CHYB, J. (1994). Impact of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane exposure on plasma gonadotropin levels and *in vitro* stimulation of gonadal steroid production by carp hypophyseal homogenate in *Carassius auratus*. *J. Fish Biol.* **44**, 195-204.
- SINGH, S., SINGH, T.P. (1987). Evaluation of toxicity limit and sex hormone production in response to Cythion and BHC in the vitellogenic catfish, *Clarias batrachus*. *Environ. Res.* **42**, 482-488.
- SLATER, C.H., SCHRECK, C.B. (1993). Testosterone alters the immune response of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**, 291-298.
- SOLOMON *et al.* (1996). Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15** (1), 31-76, © SETAC.



SOLOMON, K.R. (1998). Endocrine modulating substances in the environment: The wildlife connection. *International Journal of Toxicology* **17**, 159-172.

SOVENYI, J., SZAKOLCZAI, J. (1993). Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Vet Hung* **41**, 415-426.

SPANO, L., VAN AERLE, R., TYLER, C.R., MIKOLAJCZYK, T., THOME, J.P., KESTEMONT, P. (2002). Effects of atrazine on pituitary gonadotropin, sex steroids and vitellogenesis in goldfish (*Carassius auratus*). *12<sup>th</sup> Annual Meeting of SETAC Europe, 10-16 May 2002, Vienna, Austria*, **18-39**, p. 104.

SRIVASTAVA, A.K., SRIVASTAVA, A.K. (1994). Effects of chlordecone on the gonads of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **53**, 186-191.

SUMPTER, J.P. (1998). Xenoendocrine disrupters—environmental impacts. *Toxicology letters* **102-103**, 337-342.

SZABO, A., RUBY, S.M., ROGAN, F., AMIT, Z. (1991). Changes in brain dopamine levels, oocyte growth and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following sublethal cyanide exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **21**, 152-157.

TAHIR, A., FLETCHER, T.C., HOULIHAN, D.F., SECOMBES, C.J. (1993). Effect of short-term exposure to oil contaminated sediments on the immune response of dab, *Limanda limanda* (L.). *Aquat. Toxicol.* **27**, 71-82.

THOMAS, P. (1989). Effects of Arochlor 1254 and calcium on reproductive endocrine function and ovarian growth in Atlantic croaker. *Mar. Environ. Res.* **28**, 499-503.

TYLER, C.R., SUMPTER J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish. Biol. Fisheries.* **6**, 287-318.

VAN DER KRAAK, G., ZACHAREWSKI, T., JANZ, D.M., SANDERS, B.M., GOOCH, J.W. (1998). Comparative endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. In KENDALL, R.J., DICKERSON, R.L., GIESY, J.P., SUK, W.A. (eds), *Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife. SETAC Technical Publication, Pensacola, FL: SETAC Press*, pp.97-119.

VAN DER KRAAK, G.J., MUNKITTRICK, K.R., McMASTER, M.E., PORTT, C.B., CHANG, J.P. (1992). Exposure to bleached kraft mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**, 224-233.

VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L., NOWAK, B., ENGELSMA, M.Y., WEYTS, F.A.A. (1999). Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. *Fish & Shellfish Immunol.* **9**, 405-415.

VICTOR, B., MAHALINGAM, S., SAROJINI, R. (1986). Toxicity of mercury and cadmium on oocyte differentiation and vitellogenesis of the teleost, *Lepidocephalichthys thermalis* (Bleeker). *J. Environ. Biol.* **7**, 209-214.

VON WESTERHAGEN, H., CAMERON, P., DETHLEFSEN, V., JANSSEN, D. (1989). Chlorinated hydrocarbons in North Sea whiting (*Merlangus merlangus* L.), and effects on



reproduction: I. Tissue burden and hatching success. *Helgolaender Meeresuntersuchungen* **43**, 45-60.

VOS, J.G., DYBING, H.A., LADEFELD, O., LOMBRE, C., TARAZONA, J.V., BRANDT, I., VETHOOK, A.D. (2000). Health effect of endocrine disrupting chemicals on wildlife system, with a special reference to the European situation. *Critical Review in Toxicology* **30** (1), 71-133.

WALCZAK, B.Z., BLUNT, B.R., HODSON, P.V. (1987). Phagocytic function of monocytes and haematological changes in rainbow trout injected intraperitoneally with benzo(a)-pyrene (BaP) and benzo(a)anthracene (BaA). *J. Fish. Biol.* **31A**, 251-253.

WANG, R., BELOSEVIC, M. (1994). Estradiol increases susceptibility of goldfish to *Trypanosoma danilewskyi*. *Dev. Comp. Immunol.* **18**, 377-387.

WARING, C.P., MOORE, A. (1997). Sublethal effects of a carbamate pesticide on pheromonal mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiol. Biochem.* **17**, 203-211.

WESTER, P.W., VETHAAK, A.D., VAN MUISWINKEL, W.B. (1994). Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology* **86**, 213-232.

WINKELHAKE, J.L., VODICNIK, M.J., TAYLOR, J.L. (1983). Induction in rainbow trout of an acute phase (C-reactive) protein by chemicals of environmental concern. *Comp. Biochem. Physiol. C* **74**, 55-58.

YAMAGUCHI, T., WATANUKI, H., SAKAI, M. (2001). Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **129**, 49-55.

YANO, T. (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T., editors. The fish immune system. *Fish Physiology series vol. 15 San Diego, CA : Academic Press*, pp. 106-157.

YASUNO, M., HATAKEYAMA, S., MIYASHITA, M. (1980). Effects on reproduction in the guppy (*Poecilia reticulata*) under chronic exposure to temephos and fenitrothion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **25**, 29-33.

ZEEMAN, M.G., BRINDLEY, W.A. (1981). Effects of toxic agents upon fish immune systems: a review. In: SHARMA, R.P. (Ed.). *Immunologic Considerations in Toxicology. Vol. II, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida*.

ZELIKOFF, J.T. (1998). Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals ? *Toxicology* **129**, 63-71.

ZELIKOFF, J.T., BOWSER, D., SQUIBBS, K.S., FRENKEL, K. (1995). Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *J. Toxicol. Environ. Health* **45**, 235-248.

ZELIKOFF, J.T., ENANE, N.A., BOWSER, D., SQUIBB, K.S., FRENKEL, K. (1991). Development of fish peritoneal macrophages as a model for higher vertebrates in



---

immunotoxicological studies. 1. Characterization of trout macrophage morphological, functional and biochemical properties. *Fundam. Appl. Toxicol.* **16**, 576-589.

## **Annexes**



## Annexes

### Annexe 1.

Protocole de préparation des solutions d'atrazine utilisées pour la contamination initiale :

- 0,15g (dose 100µg/l) ou 0,015g (dose 10µg/l) d'atrazine (Atrazine PESTANAL® Riedel-de-haën)
- 8ml acétone (Solubilité de l'atrazine dans l'acétone : 31g/l)
- Agiter jusqu'à dissolution complète de l'atrazine
- Verser la solution d'atrazine dans 1 litre d'eau milliQ
- Agiter et chauffer la solution jusqu'à 90°C (la température d'évaporation de l'acétone est de 56°C)
- Agiter jusqu'à homogénéisation complète
- Laisser refroidir la solution
- Verser dans l'ESCADA

### Annexe 2.

Protocole d'extraction de l'atrazine sur cartouche.

- Prendre 200ml d'eau dans les bassins contaminés
- Filtrer le volume prélevé sur un filtre pour HPLC de 45 nm via une pompe à vide
- Conditionner la cartouche (Waters Oasis HLB) avec 3 ml d'acétonitryl
- Faire passer 3 ml de l'eau filtrée sur la cartouche
- Faire passer les 200 ml d'eau filtrée sur la cartouche
- Rincer la cartouche avec 6 ml d'eau milliQ
- Faire passer 3 ml d'acétonitryl sur la cartouche
- Récupérer l'éluat dans une fiole pour HPLC
- Procéder à la lecture et comparer les résultats obtenus avec une solution standard d'atrazine (Pesticide –Mix 15, Dr. Ehrenstorfer)

### Annexe 3.

Protocole de la double extraction des stéroïdes sexuels

- Prélever 50µl de plasma dans des tubes en verre
  - Ajouter 1ml d'une solution de cyclohexane/éthylacétate (1/1)
  - Passer une minute au vortex
  - Mettre pendant une heure et trente minutes à -20°C
  - Récupérer la phase organique par retournement des tubes (\*)
  - Ajouter 1ml d'une solution de cyclohexane/éthylacétate (1/1) au culot
  - Passer une minute au vortex
  - Mettre pendant une heure et trente minutes à -20°C
  - Récupérer la phase organique par retournement des tubes
  - Evaporer la phase organique à l'aide d'air sous pression
  - Boucher les tubes et conserver à -20°C jusqu'au moment du dosage
- (\*) Les deux phases organiques sont récupérées dans un même tube en verre

## Annexe 4.

Protocole du dosage des stéroïdes plasmatiques (Fostier et Jalabert, 1986)

### a. Matériel

#### 1. Tampon phosphate

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,01 M	anhydre	1,20 g/l (si monohydraté: 1,37 g/l)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,01 M	anhydre	1,42 g/l
$\text{NaCl}$	0,90%		9,0 g/l

Ajuster le pH à 7,25 avec du NaOH

#### 2. Tampon phosphate gélatiné (TPG)

Ajouter 1 g de gélatine par litre de tampon phosphate (diluer la gélatine dans une partie du tampon chauffé à 60°C en agitant).

#### 3. Tampon polyéthylèneglycérol 25% (PEG)

Ajouter 25 g de PEG à 75 ml de tampon phosphate sans gélatine.

#### 4. Courbe standard

Pour chaque hormone, on prépare une solution mère (M) : 100 µg d'hormone froide dans de l'éthanol absolu à température ambiante (20°C). Les trois hormones utilisées sont les suivantes :

- 17β-oestradiol de bovin (SIGMA E-8875)
  - testostérone de bovin (SIGMA T-1500)
  - 11-kétotestostérone (....)
- Solution A : 1 ml de M porté à 100 ml avec du TPG : 1 µg/l
  - Solution B : 1 ml de A porté à 10 ml avec du TPG : 100 ng/ml
  - Solution C : 1 ml de B porté à 10 ml avec du TPG : 10 ng/ml
  - Solution D : 1 ml de C porté à 10 ml avec du TPG : 1 ng/ml

Répartition dans des tubes en verre : cfr tableau

### b. Méthode

- Ajouter 300 µl de tampon phosphate gélatiné (TPG) 0,01M dans chaque tube extrait
- Passer au vortex
- Reprendre 100 µl d'échantillon en duplicata dans des tubes en polyéthylène
- Ajouter 100 µl d'anticorps dans tous les tubes y compris les standards ; les deux tubes servant à la mesure de la radioactivité naturelle (back ground) sont exclusivement composés de 200 µl de TPG et 100 µl d'hormone marquée
- Vortexer
- Ajouter 100 µl de traceur, soit d'hormone radioactive (marquée au  $\text{H}^3$ ) à tous les tubes et prévoir deux tubes supplémentaires avec seulement 100 µl de traceur pour l'évaluation de la fixation totale (TC)
- Vortexer



- Chauffer pendant une heure et demi à 37°C
- Pré-incuber pendant deux heures à 4°C
- Ajouter 2 ml de PEG 25%
- Incuber une nuit à 4°C
- Centrifuger à 3500 g pendant 30 minutes et ce à 10°C
- Eliminer le surnageant par retournement des tubes
- Ajouter 2 ml de PEG 25%
- Centrifuger à 3500 g pendant 20 minutes et ce à 10°C
- Eliminer le surnageant par retournement des tubes
- Reprendre par 100 µl d'éthanol absolu (dans tous les tubes y compris le TC)
- Vortexer
- Ajouter 2,5 ml de liquide scintillant (Ecoscint A)
- Boucher les tubes et agiter vigoureusement
- Chauffer à température ambiante
- Passer au compteur à scintillation

Les références quant aux anticorps et hormones marquées utilisés sont les suivantes :

- Anticorps de lapin anti- T de bovin (Laboratoire d'hormonologie de Marloie )
- Anticorps de lapin anti-E2 de bovin (Laboratoire d'hormonologie de Marloie )
- Anticorps de lapin anti-11-KT de carpe (fourni gracieusement par le professeur Fostier, INRA, Rennes, France)
- [ $H^3$ ]oestradiol (Amersham pharmacia biotech TRK587)
- [ $H^3$ ]testostérone (Amersham pharmacia biotech TRK921)
- 11-keto[ $H^3$ ]testostérone (Amersham pharmacia biotech TRQ8945)

## Annexe 5.

Protocole du dosage du glucose

### a. Matériel

#### 1. Solution réactionnelle

- 129 mg de glucose oxydase d'*Aspergillus niger* lyophilisé Grad II (Sigma G-6125/G-7773 à 15.500 UI/g solide)
- 0,7 mg de peroxydase de radis lyophilisée Grad II (Roche 127361 à 10.000 UI/ 45,5mg lyo)
- 125 mg de 2,2'-diazino 3-éthylbenzothiazoline 6-sulfonate (ABTS) (Roche 102946)

#### 2. Acide perchlorique 0,33M

La solution est réalisée à partir d' $HClO_4$  à 70%

- 28,35 ml d' $HClO_4$  concentré
- 1 litre d'eau distillée

### 3. Tampon phosphate

#### Tampon 0,6M :

- 3,75 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (PM=136,09)
- 38,95 g de  $\text{NaHPO}_4$  (PM=141,96)
- 500 ml d'eau distillée

#### Tampon 0,1M :

- 166,66 ml de tampon 0,6M
- 833,34 ml d'eau distillée

Ajuster à pH 7,5

### 4. Standard

On réalise une courbe standard comprenant 7 niveaux de dilution, les différents points ont été choisis en fonction des niveaux en glucose connus chez différentes espèces de poisson.

- Solution A : 100 mg de glucose + 100 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution B diluée 2X : 250  $\mu\text{l}$  de A + 250  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution C diluée 4X : 250  $\mu\text{l}$  de A + 750  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution D diluée 8X : 250  $\mu\text{l}$  de C + 250  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution E diluée 10X : 100  $\mu\text{l}$  de A + 900  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution F diluée 20X : 250  $\mu\text{l}$  de E + 250  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$

## **b. Méthode**

### 1. Déprotéinisation

Dans des eppendorf, on place :

- 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{HClO}_4$  0,33M
- 50  $\mu\text{l}$  de plasma, solution standard ou tampon 0,1M
- vortexer
- centrifuger pendant 10 minutes à 3000 rpm

### 2. Analyse

Dans des tubes à hémolyse, on place :

- 2 ml de la solution réactionnelle
- 25  $\mu\text{l}$  du surnageant de déprotéinisation (mesures réalisées en duplicata pour les échantillons et en replicata pour les différents standards)
- agiter
- incuber pendant 15 minutes au bain-Marie chauffé à 38°C
- mesurer la densité optique (D.O) à 436 nm via spectrophotomètre (Beckman DU 640)



## Annexe 6.

Protocole du dosage du lysozyme.

### a. Matériel

#### 1. Tampon phosphate

Dans 500 ml d'eau distillée, on dissout:

- 7,02 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2,6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,9 g  $\text{NaCl}$

Ensuite, la solution est ramenée à un volume de un litre. On ajuste le pH à 6,3

#### 2. Solution de *Micrococcus luteus*

- 0,012 g de *Micrococcus* lyophilisé (Sigma, M-3770) dans 30 ml du tampon phosphate

#### 3. Solution de lysozyme

- dissoudre 2 mg de lysozyme de blanc d'œuf de poule grade VI (Sigma, L-2879, 46,600 UI/mg solid)

### b. Courbe standard

- Solution A : 200 µl de la solution lyso dans 5,8 ml d'eau distillée contenant 0,0052g de  $\text{NaCl}$
- Solution B : 0,5 ml de A + 0,5 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution C : 0,25 ml de A + 0,75 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution D: 0,125 ml de A + 0,875 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution E: 0,125 ml de A + 1,875 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution F: 0,125 ml de A + 3,875 ml d' $\text{H}_2\text{O}$
- Solution G: 0,125 ml de A + 7,875 ml d' $\text{H}_2\text{O}$

### c. Analyse

- Dans une plaque ELISA 96 puits à fond plat on effectue:
  - un blanc individuel pour chacun des échantillons à doser.
    - 25 µl de plasma + 200 µl de tampon
    - mesure de la DO à 590 nm au moyen d'un lecteur ELISA (Packard Spectra count <sup>TM</sup>)
  - une mesure de la dégradation des bactéries par le lysozyme
    - 200 µl de *µcoccus* + 25 µl des différentes solution sstandards ou de plasma
    - mesure de la DO à 590 nm au moyen d'un lecteur ELISA (Packard Spectra count <sup>TM</sup>)

## Annexe 7.

Protocole du dosage des ions superoxydes par réduction du NBT

### a. Matériel

#### 1. Tampon PBS

Dans un litre d'eau distillée on ajoute:

- NaCl: 0,8 g
- KCl: 0,2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,15 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,2 g

Le pH est ajusté à 7,4 unités

### b. Courbe standard

- Dans un tube à essai, on place: 4 mg de NBT dans 500 µl/d'eau distillée

- Solution A : 50 µl de sang + 0 µl solution NBT
  - Solution B : 50 µl de sang + 5 µl solution NBT
  - Solution C : 50 µl de sang + 10 µl solution NBT
  - Solution D: 50 µl de sang + 25 µl solution NBT
  - Solution E: 50 µl de sang + 50 µl solution NBT
  - Solution F: 50 µl de sang + 75 µl solution NBT
- On laisse réagir pendant 30 minutes
- Passer les tubes au vortex
- Reprendre 50 µl de la solution vortexée
- Sous la hôte, on ajoute 1 ml de Formamide
- Centrifuger pendant 5 minutes à 9500 rpm
- Reprendre 800 µl et les mettre dans une cuvette en quartz
- Lecture de la DO à 620 nm

### c. Analyse

Le protocole est le même pour les échantillons, excepté la solution de NBT qui est mise au point à l'aide de 6 mg de NBT placés dans 3 ml de PBS